การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* จากอาหารหมักของไทยเพื่อผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก

โดย

นางสาวพรกนก คีรีวัลย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* จากอาหารหมักของไทยเพื่อผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก

โดย

นางสาวพรกนก คีรีวัลย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA *Lactobacillus plantarum* FROM THAI FERMENTED FOOD FOR CONJUGATED LINOLEIC ACID PRODUCTION

BY

MISS PORNKANOK KEEREEWAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
THAMMASAT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2015

COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาวพรกนก คีรีวัลย์

เรื่อง

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum*
จากอาหารหมักของไทยเพื่อผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

เมื่อ วันที่ 6 มกราคม พ.ศ. 2559

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ _____
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก _____
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม _____
(ดร. กอบกุล เหล่าเท้ง)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ _____
(ดร. ศรินทิพ สุกใส)

คณบดี _____
(รองศาสตราจารย์ ปกรณ์ เสริมสุข)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* จากอาหารหมักของไทยเพื่อผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก
ชื่อผู้เขียน	นางสาวพรกนก คีรีวัลย์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. กอบกุล เหล่าเท้ง
ปีการศึกษา	2558

บทคัดย่อ

กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก (conjugated linoleic acid, CLA) เป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอนจำนวน 18 อะตอมและมีการจัดเรียงพันธะคู่แบบคอนจูเกต โดยไอโซเมอร์ที่พบได้ทั่วไปได้แก่ 9CLA ที่ประกอบด้วย 9CLA-1 (*cis-9, trans-11* C18:2) และ 9CLA-2 (*trans-9, trans-11* C18:2) และ 10CLA (*trans-10, cis-12* C18:2) ซึ่งเป็นไอโซเมอร์ที่มีประโยชน์ทางด้านชีวภาพ เช่น เป็นสารต้านโรคมะเร็ง ลดไขมันอุดตันในเส้นเลือด และส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นต้น การผลิต CLA โดยแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* เกิดขึ้นจากกระบวนการไบโอไฮโดรจิเนชั่นของกรดไลโนเลอิก (*cis-9, cis-12* C18:2) หรือ LA เปลี่ยนเป็น CLA โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไลโนเลเอตไอโซเมอเรส ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่มีศักยภาพในการผลิต CLA จากการนำ *L. plantarum* ที่แยกได้จากอาหารหมักของไทย จำนวน 44 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหารเหลว Modified MRS ที่มีการเติม LA เพื่อใช้เป็นสับสเตรท ผลพบว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* 4 ไอโซเลต ได้แก่ NB05 NB289 NB311 และ NB324 มีศักยภาพในการผลิต CLA โดย *L. plantarum* NB05 และ NB289 มีความสามารถในการผลิต CLA ได้สูงสุดประมาณ 32.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสับสเตรทต่อการผลิต CLA พบว่าผลผลิต CLA เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ LA ที่เพิ่มขึ้น โดยไอโซเลต NB05 และ NB289 มีความแตกต่างใน

การเจริญเติบโตและการผลิต CLA เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี LA ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยไอโซเลต NB05 ให้ผลผลิต CLA ทั้งหมดสูงสุด 152.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลได้ของ CLA จากเซลล์ 62.6 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$ และอัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA เท่ากับ 54.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเข้มข้น LA เท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์ (280 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ *L. plantarum* NB289 ให้ผลผลิต CLA ทั้งหมดสูงสุด 112.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลได้ของ CLA จากเซลล์ 53.7 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$ และอัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA เท่ากับ 58.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเข้มข้น LA เท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์ (140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ส่วนการศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิต CLA โดยเลี้ยงในอาหารที่มี LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ในการศึกษาที่พีเอชเริ่มต้น 7.5 พบว่า *L. plantarum* ไอโซเลต NB05 และ NB289 ให้ผลผลิต CLA ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 59.6 และ 102.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลได้ของ CLA จากเซลล์ 19.9 และ 36.6 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$ และอัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA เท่ากับ 51.6 และ 63.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ค่าพีเอชเริ่มต้นยังมีผลต่อชนิดของไอโซเมอร์ของ CLA ที่เซลล์ผลิตได้ โดย *L. plantarum* NB05 ผลิตไอโซเมอร์ 9CLA-1 เป็นส่วนใหญ่ เมื่อเลี้ยงที่พีเอช 5.0, 7.0 และ 7.5 ในขณะที่ *L. plantarum* NB289 สามารถผลิตไอโซเมอร์ 9CLA-1 ได้สูงสุดที่พีเอชในช่วงความเป็นกรด (พีเอช 5.0 และ 5.5)

การศึกษาอิทธิพลของพีเอชควบคุมต่อการผลิต CLA ของ *L. plantarum* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าการเลี้ยงไอโซเลต NB05 NB289 NB311 และ NB324 ภายใต้สภาวะพีเอชควบคุมและเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ได้ทำการเติม LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ผลพบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตของทั้ง 4 ไอโซเลต คือ พีเอช 6.5 ในขณะที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA แตกต่างกัน โดยทุกไอโซเลตให้ 9CLA-1 เป็นไอโซเมอร์หลัก (ร้อยละ 70-80 ของ CLA ทั้งหมด) ทั้งนี้ พบว่าที่พีเอช 5.5 ไอโซเลต NB05 ให้ผลผลิต CLA ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 114.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนไอโซเลต NB324 และ NB311 ผลิต CLA ทั้งหมดเท่ากับ 28.2 และ 22.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลต NB289 จะให้ผลิต CLA ทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 44.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อพีเอชควบคุมเท่ากับ 6.5

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* NB289 ภายใต้สภาวะพีเอชควบคุมและมีการเติม LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมัก พบว่าพีเอชควบคุม 5.5 ให้ผลผลิต CLA ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 103.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้ไอโซเมอร์ 9CLA-2 เป็นผลิตภัณฑ์หลัก คิดเป็นร้อยละ 60-70 ของ CLA ทั้งหมด ซึ่งมีค่าสูงกว่าการทดลองที่เลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการควบคุมพีเอช ที่ให้ผลผลิต CLA ทั้งหมดเพียง 12.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้

เห็นว่าการควบคุมพีเอชให้เหมาะสมและการเติมสับสเทรต LA ตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมักสามารถส่งเสริมการผลิต CLA ได้

คำสำคัญ: กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก, แบคทีเรียกรดแลคติก, *Lactobacillus plantarum*, กรดไขมันไลโนเลอิก, เอนไซม์ไลโนเลเอตไอโซเมอเรส

Thesis Title	Selection of lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* from Thai fermented food for conjugated linoleic acid production
Author	Miss Pornkanok Keereewan
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department/Faculty/University	Department of Biotechnology Faculty of Science and Technology Thammasat University
Thesis Advisor	Assitant Professor Theppanya Charoenrat, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Kobkul Laoteng, D.Sc.
Academic Years	2015

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) is 18-carbon fatty acids which have conjugated double bonds and difference in geometric isomers. The most common isomers include 9CLA [9CLA-1 (*cis-9, trans-11* C18:2) and 9CLA-2 (*trans-9, trans-11* C18:2)] and 10CLA (*trans-10, cis-12* C18:2), which have biological benefits, such as anti-cancer, anti-antherosclerosis and immune promoting molecules. CLA is produced by lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, *via* biohydrogenation, which is a biotransformation process of linoleic acid (LA: *cis-9, trans-12* C18:2) catalyzed by linoleate isomerase (LAI). This study aims to select lactic acid bacteria, *L. plantarum* isolates, which have potential in CLA production. Among 44 isolates of *L. plantarum* derived from Thai fermented foods, isolate NB05, NB289, NB311 and NB324 showed potential in CLA production. When cultivated in the modified MRS (MMRS) medium supplemented with LA as a substrate, the highest CLA productions were found in NB05 and NB289 cultures, in which the CLA content was approximate 32.7 μg/mL.

Further study on effect of substrate concentration on CLA production showed that the CLA increased with the increase of the added LA concentration. When supplemented with different LA concentrations, the isolate NB05 and NB289 displayed differences in cell growth and CLA production. The highest total CLA production was obtained in the NB05 culture added with 2.0 mM LA. The total CLA, specific yield of CLA, and substrate conversion rate were 152.2 μg/mL, 62.6 mg/g_{cell}, and 54.0% conversion, respectively. Whereas the NB289 cultures with 1.0 mM LA exhibited the maximum total CLA, specific yield of CLA, and substrate conversion rate were 112.9 μg/mL, 53.7 mg/g_{cell}, and 58.7% conversion, respectively.

The influence of initial pH of culture medium on CLA production was studied showing that the NB05 and NB289 cultures grown at initial pH 7.5 in the presence of 1.0 mM LA produced total CLA of 59.6 and 102.6 μg/mL, respectively. Under this cultivation condition, the NB05 and NB289 showed 19.9 mg/g_{cell} specific yield of CLA with 51.6% of substrate conversion and 36.6 mg/g_{cell} specific yield of CLA with 63.6% of substrate conversion, respectively. In addition, the initial pH affected CLA isomers, in which the 9CLA-1 was predominant in NB05 isolate cultivated at pH 5.0, 7.0 and 7.0, whereas lower pH values (pH 5.0 and 5.5) promoted 9CLA-1 production in the NB289 culture.

The influence of pH control on CLA production of *L. plantarum* was studied in a bioreactor. By varying the controlled pH values and adding 1.0 mM LA at early stationary phase, it was found that pH 6.5 was optimum for cell growths of the NB05, NB289, NB311 and NB324 cultures, whereas the optimal pH for CLA production was depended on *L. plantarum* isolates. For all four isolates, the major isomer produced was 9CLA-1 (70-80% of total CLA). The maximum total CLA of 114.5 μg/mL was observed in the NB05 culture at pH 5.5. The highest total CLA of the NB324 and NB311 were also obtained at pH 5.5 with 28.2 and 22.6 μg/mL, respectively. However, the highest total CLA of 44.4 μg/mL was obtained from NB289 at pH 6.5.

When cultivated *L. plantarum* NB289 under the pH control in the presence of 1.0 mM LA at the beginning of fermentation process, the highest total

CLA (103.4 μg/mL) was found in the culture controlled at pH 5.5, and 9CLA-2 was predominant isomer (60-70% of total CLA) that was higher than the culture without pH control (12.6 μg/mL CLA). These results indicated the control of optimal pH and addition of substrate LA at the beginning of the cultivation process could enhance the CLA production.

Keywords: Conjugated linoleic acid, Lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, Linoleic acid, Linoleate isomerase

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ ประสบการณ์ คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ ความเอื้อเฟื้อและการดูแลเอาใจใส่ตลอดมาจวบจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ดร. กอบกุล เหล่าเท้ง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้ให้ข้อคิด คำแนะนำ แนวทางการแก้ปัญหา การตรวจทานแก้ไขและปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ และขอขอบคุณความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. ศริณทิพ สุกใส คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ตลอดจนข้อเสนอแนะต่างๆ

ขอขอบคุณ ดร. วรรณพ วิเศษสงวน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ในการให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *Lactobacillus plantarum* สำหรับใช้ในวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณอาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และความช่วยเหลือต่างๆ ที่มอบให้เสมอมา

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ รวมทั้งทุกๆ ท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำตลอดการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่อยู่เบื้องหลังคอยสนับสนุนเป็นกำลังใจและแรงผลักดันเสมอมา

นางสาวพรกนก คีรีวัลย์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญตาราง	(14)
สารบัญภาพ	(16)
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	(21)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก (Conjugated linoleic acid, CLA)	3
2.1.1 โครงสร้างทางเคมีและการค้นพบ	3
2.1.2 ความสำคัญของกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก	4
2.1.3 การสังเคราะห์กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก	5
2.2 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)	6

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.1 ลักษณะทั่วไป	6
2.2.2 บทบาทในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก	7
2.2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการผลิต CLA จากแบคทีเรียกรดแลคติก	10
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก	14
2.3.1 ปัจจัยเนื่องจากไอโซเลตจุลินทรีย์	14
2.3.2 ปัจจัยเนื่องจากความเข้มข้นของสับสเตรทหรือกรดไขมันไลโนเลอิก	14
2.3.3 ชนิดของอาหารและสับสเตรท	14
2.3.4 ค่าพีเอช	15
2.3.5 อุณหภูมิ	15
2.3.6 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง	16
2.3.7 ออกซิเจนหรือการให้อากาศ	16
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	18
3.1 อุปกรณ์และไอโซเลตจุลินทรีย์	18
3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ	18
3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	18
3.1.3 ไอโซเลตจุลินทรีย์และการเก็บรักษา	19
3.2 การเตรียมสับสเตรทกรดไขมันไลโนเลอิกและน้ำมันถั่วเหลือง	19
3.2.1 กรดไขมันไลโนเลอิก	19
3.2.2 น้ำมันถั่วเหลือง	20
3.3 การทดลองที่ I : การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *L.plantarum* ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกได้สูง	20
3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ	20
3.3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการผลิต CLA ได้สูง	20

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.3 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเติบโตและความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* 21
3.3.4 ชนิดของอาหารหมักที่เป็นแหล่งของ *L. plantarum* ต่อความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก 21
3.3.5 อัตราการเปลี่ยนรูปกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก 21
3.4 การทดลองที่ II : การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิกต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจาก *L. plantarum* ที่คัดเลือก 22
3.5 การทดลองที่ III : การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจาก *L. plantarum* ที่คัดเลือกได้ 22
3.6 การทดลองที่ IV : การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้อิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองเป็นสับสเตรทเพื่อผลิต CLA 23
3.7 การทดลองที่ V : การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 23
3.7.1 การเตรียมกล้าเชื้อ 23
3.7.2 การเตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 23
3.7.3 กระบวนการหมักแบบแบทช์ 24
3.8 การวิเคราะห์ 25
3.8.1 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ 25
3.8.2 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช 25
3.8.3 การสกัดลิปิด 25
3.8.4 การเตรียมเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน 25
3.8.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี 26
3.8.6 การวิเคราะห์ผลปริมาณกรดไขมัน 26
3.8.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ 27

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 28

4.1 การทดลองที่ I : การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก 28

4.1.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเติบโตและความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* 42

4.1.1.1 การศึกษาการเติบโตของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต 42

4.1.1.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต 43

4.1.1.3 การศึกษาปริมาณกรดไขมันทั้งหมดของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต 44

4.1.1.4 การศึกษาผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต 45

4.1.1.5 การศึกษาความเข้มข้นของ CLA ของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต 46

4.1.1.6 การศึกษาผลได้ CLA จากเซลล์ของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต 47

4.1.1.7 การศึกษาร้อยละของ CLA ที่เป็นองค์ประกอบในกรดไขมันทั้งหมดของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต 48

4.1.2 ชนิดของอาหารหมักที่เป็นแหล่งของ *L. plantarum* ต่อความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก 49

4.1.3 อัตราการเปลี่ยนรูปกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก 52

4.2 การทดลองที่ II : การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิกต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจาก *L. plantarum* ที่คัดเลือกได้ 53

4.2.1 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณการผลิต CLA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่คัดเลือก 53

4.2.2 การผลิต CLA แต่ละไอโซเมอร์ ของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* 60

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.3 อัตราการเปลี่ยนรูปกรดไขมันไลโนเลอิก
ไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก 61
4.3 การทดลองที่ III : การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจาก *L. plantarum* ที่คัดเลือกได้ 62
4.3.1 อิทธิพลของค่าพีเอชต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณการผลิต CLA
ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่คัดเลือก 62
4.3.2 อิทธิพลของพีเอชต่อไอโซเมอร์ของ CLA ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก
L. plantarum 68
4.3.3 อัตราการเปลี่ยนรูปกรดไขมันไลโนเลอิก
ไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก 69
4.4 การทดลองที่ IV : การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้อิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลือง
เป็นสับสเตรทเพื่อผลิต CLA 70
4.5 การทดลองที่ V : การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเติบโตและการผลิต
กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 73
4.5.1 อิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum*
(1) การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตกรดไขมัน
คอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ
4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 พร้อมทั้งเติมกรดไขมันไลโนเลอิกความเข้มข้น
1.0 มิลลิโมลาร์เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) 73
(2) การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตกรดไขมัน
คอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ
4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 และเติมกรดไขมันไลโนเลอิกความเข้มข้น
1.0 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก
L. plantarum ไอโซเลต NB289 85

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

(3) การศึกษาการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลต NB289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เมื่อไม่มีการควบคุมค่าพีเอชระหว่างการเพาะเลี้ยงและเติมกรดไขมันไลโนเลอิก ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) 91
(4) การศึกษาการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum*ไอโซเลต NB289ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เมื่อไม่มีการควบคุมค่าพีเอชระหว่างการเพาะเลี้ยงและเติมกรดไขมันไลโนเลอิก ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง 92

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 97
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 101
รายการอ้างอิง 102
ภาคผนวก 111
ภาคผนวก ก 113
ภาคผนวก ข 115
ภาคผนวก ค 117
ภาคผนวก ง 119
ประวัติผู้เขียน 186

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยกระบวนการไอโซเมอร์ไรเซชันของกรดไขมันไลโนเลอิกในสภาวะต่าง	5
2-2 การผลิต CLA จากแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactobacillus* ในสภาวะที่มีการเสริมกรดไขมันไลโนเลอิก	7
2-3 ปริมาณการผลิต CLA โดยแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactobacillus*	8
4-1 สัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ	29
4-2 สัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบ ในน้ำหมักจากการเลี้ยง *L. plantarum* ไอโซเลตต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS	32
4-3 สัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในน้ำหมักจากจากเลี้ยง ของ *L. plantarum* ไอโซเลตต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS ที่เติม LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ (MMRS+LA)	37
4-4 ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB05 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่แปรผันการเติม LA	55
4-5 ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่แปรผันการเติม LA	57
4-6 ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB05 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่แปรผันค่าพีเอชเริ่มต้น	66
4-7 ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่แปรผันค่าพีเอชเริ่มต้น	67
4-8 ปริมาณ LA คงเหลือในส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหาร MMRS ที่เติมอิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 0 และ 72 ชั่วโมง	71
4-9 ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB05 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่	77

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4-10 ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ 78

4-11 ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB324 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ 79

4-12 ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB311 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ 80

4-13 ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง 90

4-14 ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่ระยะเวลาต่างกันและไม่มีการควบคุมพีเอช 96

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 โครงสร้างของ 9CLA และ 10CLA	4
2-2 ตัวอย่างกระบวนการเปลี่ยนกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็น CLA ของ *L. plantarum*	9
2-3 กระบวนการเปลี่ยนกรดไขมันไรซิโนเลอิกไปเป็น CLA ของ *L. plantarum*	10
4-1 โครมาโตแกรมแสดงชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำหมักส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB05	30
4-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต	42
4-3 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต	43
4-4 ค่าพีเอชของน้ำหมักของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต	43
4-5 ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดจากน้ำหมักของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต	44
4-6 ผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดจากน้ำหมักของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต	45
4-7 ความเข้มข้นของ CLA ทั้งหมดในน้ำหมักของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต	47
4-8 ผลได้ CLA จากเซลล์ของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต	48
4-9 ร้อยละของ CLA ในกรดไขมันทั้งหมดของน้ำหมักของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต	49
4-10 ปริมาณกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมดในน้ำหมักส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* ไอโซเลตต่างๆ	50
4-11 ปริมาณกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมดในน้ำหมักส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* ในอาหาร MMRS+LA	51
4-12 อัตราการเปลี่ยนกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ในน้ำหมักส่วนใสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS+LA	52
4-13 รูปแบบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MMRS ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก	54
4-14 การผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB05 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหาร MMRS ที่แปรผันการเติมกรดไขมันไลโนเลอิก	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-15 การผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB289 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหาร MMRS ที่แปรผันการเติมกรดไขมันไลโนเลอิก 57

4-16 เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิกต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจากแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ทั้งสองไอโซเลต 60

4-17 สัดส่วนของแต่ละไอโซเมอร์ของกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลต NB05 และ NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 61

4-18 อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้น LA ไปเป็นผลิตภัณฑ์ CLA ของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลต NB05 และ NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 62

4-19 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับพีเอชเริ่มต้นด้วยบัฟเฟอร์ที่ระยะเวลาต่างๆ 65

4-20 ผลของพีเอชต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต *L. plantarum* NB05 และ *L. plantarum* NB289 65

4-21 ผลของพีเอชต่อไอโซเมอร์ของกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง 69

4-22 ผลของพีเอชต่ออัตราการเปลี่ยนรูปกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลต NB05 และ NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง 70

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-23 โครมาโตแกรมแสดงชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำหมักของ *L. plantarum* NB05 ที่เพาะเลี้ยงใน (ก) อาหารเหลว MMRS (ตัวควบคุมเชิงลบ) (ข) อาหารเหลว MMRS ที่เติม LA 1.0 มิลลิโมลาร์ (ตัวควบคุมเชิงบวก) (ค, ง, จ และ ฉ) อาหารเหลว MMRS ที่เติมอีมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ 72

4-24 อิทธิพลของพีเอชต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลตที่เลี้ยง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ 74

4-25 อิทธิพลของพีเอชต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลตที่เลี้ยง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ 75

4-26 อิทธิพลของพีเอชต่อการผลิต CLA ของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลตที่เลี้ยง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ 75

4-27 อิทธิพลของพีเอชต่อการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB05 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ 76

4-28 รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB05 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอช ในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ 81

4-29 รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอช ในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ 82

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-30 รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB324 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอช ในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ 83

4-31 รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB311 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอช ในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ 84

4-32 อิทธิพลของพีเอชต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. plantarum* NB289 ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอช ในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง 86

4-33 อิทธิพลของพีเอชต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *L. plantarum* NB289 ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอช ในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง 86

4-34 อิทธิพลของพีเอชต่อการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง 87

4-35 รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอช ในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง 89

4-36 เปรียบเทียบอิทธิพลของช่วงเวลาในการเติมสับสเตรท LA และพีเอชต่อการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอช และช่วงเวลาในการเติมสับสเตรท 90

4-37 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่ช่วงเวลาแตกต่างกันและไม่ควบคุมพีเอช 93

4-38 อิทธิพลของพีเอชต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. plantarum* NB289 ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่ช่วงเวลาแตกต่างกันและไม่ควบคุมพีเอช 93

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-39 อิทธิพลของพีเอชต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *L. plantarum* NB289 ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่ช่วงเวลาแตกต่างกันและไม่ควบคุมพีเอช 94

4-40 อิทธิพลของพีเอชต่อการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่ช่วงเวลาแตกต่างกันและไม่ควบคุมพีเอช 94

4-41 เปรียบเทียบการผลิต CLA ที่แต่ละช่วงเวลาในการเติมสับสเตรท LA ที่มีการควบคุมพีเอชและไม่ควบคุมพีเอชของ *L. plantarum* NB324 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เลี้ยงด้วยอาหาร MMRS และเติมสับสเตรท LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ 95

4-42 รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยไม่ควบคุมค่าพีเอชและแปรผันช่วงเวลาในการเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ 97

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์/คำย่อ	คำเต็ม/คำจำกัดความ
MRS	อาหาร de Man Rogosa and Sharp
MMRS	อาหาร Modified MRS
MMRS+LA	อาหาร Modified MRS ที่เติมกรดไขมันไลโนเลอิก
BH	กระบวนการไบโอไฮโดรจีเนชั่น
LAI	เอนไซม์ Linoleate isomerase
CLA	กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก
LA	กรดไขมันไลโนเลอิก (*c*9, *c*12$\Delta^{9,12}$)
SA	กรดไขมันสเตรียริก
9CLA-1	กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก *cis*-9, *trans*-11CLA (*c*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)
9CLA-2	กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก *trans*-9, *trans*-11CLA (*t*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)
10CLA	กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก *trans*-10, *cis*-12 CLA (*t*10, *c*12$\Delta^{10,12}$)
HA	กรดไขมันไฮดรอกซี (Hydroxy fatty acid)
SO	น้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil)
$Y_{p/x}$	ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์
μ	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญปัญหา

กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก (Conjugated linoleic acid; CLA) เป็นกรดไขมันที่มีความสำคัญต่อมนุษย์ในด้านการเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ CLA ที่พบในธรรมชาติมีหลายชนิด โดยชนิดที่มีความสำคัญและมีคุณสมบัติทางชีวภาพ คือ *cis*-9, *trans*-11 C18:2 (9CLA) และ *trans*-10, *cis*-12 C18:2 (10CLA) ซึ่งมีคุณสมบัติทางเภสัชศาสตร์ เช่น เป็นสารต้านการเกิดมะเร็ง (Ip และคณะ, 1991) ป้องกันโรคเบาหวานหรือช่วยรักษาระดับน้ำตาลในเลือดและอินซูลินให้ปกติ (Houseknecht และคณะ, 1998; Belury และคณะ, 2002) เป็นองค์ประกอบในการสร้างระบบภูมิคุ้มกันที่ช่วยเพิ่มหรือส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Hayak และคณะ, 1999) ป้องกันภาวะหลอดเลือดแดงอุดตัน (Kritchevsky และคณะ, 2002) และมีส่วนช่วยในระบบการเผาผลาญไขมัน (Huang และคณะ, 1994) CLA ส่วนใหญ่มักพบได้ในอาหารทั้งจากเนื้อสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น เนื้อโค เนื้อแกะ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น น้ำนม ผลิตภัณฑ์จากนม (อยู่ในรูป 9CLA) และน้ำมันที่ได้จากพืชบางชนิด (อยู่ในรูป 10CLA) อย่างไรก็ตาม CLA ที่พบในอาหารมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการในการบริโภค ที่มากขึ้นทำให้ความสนใจในการพัฒนาการผลิต CLA เพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก โดยมีรายงานการผลิต CLA ด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี พบว่าสามารถผลิต CLA ได้ปริมาณสูงแต่ก็ให้ผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่อยู่ในรูปไขมันทรานส์ (*trans, trans*; Trans fatty acid) ปริมาณมากเช่นกัน (Yurawecz และคณะ, 1999) ซึ่งทำให้ต้นทุนในกระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์สูงขึ้น จากปัญหาดังกล่าวจึงมีการศึกษาการผลิต CLA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus plantarum* ซึ่งมีรายงานว่าสามารถผลิต CLA จากกรดไขมันไลโนเลอิกได้ โดยสามารถผลิต CLA ได้ไอโซฟอรม์ที่มีประโยชน์และปริมาณสูง (Ogawa และคณะ, 2005) อีกทั้งไอโซเมอร์ของ CLA ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่มีไอโซเมอร์จำเพาะอยู่ในรูป 9CLA และ 10CLA ซึ่งทั้งสองไอโซเมอร์ที่ผลิตได้นี้เป็นไอโซเมอร์ที่มีประโยชน์หรือมีคุณสมบัติทางเภสัชศาสตร์ และการผลิตด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกจะไม่เกิดไอโซเมอร์ที่ไม่ต้องการปริมาณมากเหมือนการผลิต CLA จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

งานวิจัยนี้จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิต CLA ได้สูง จากแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่คัดแยกจากอาหารหมักของไทย จำนวน 44 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ร่วมกับการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อการผลิต CLA ในหลอดทดลอง และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต CLA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เพื่อนำองค์ความรู้และข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิต CLA จากแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* สำหรับอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกได้สูง

1.2.2 เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิกต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจากแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum*

1.2.3 เพื่อศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจากแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum*

1.2.4 เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้อิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองเพื่อผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจากแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum*

1.2.5 เพื่อศึกษาสภาวะพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจากแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก (Conjugated linoleic acid, CLA)

2.1.1 โครงสร้างทางเคมีและการค้นพบ

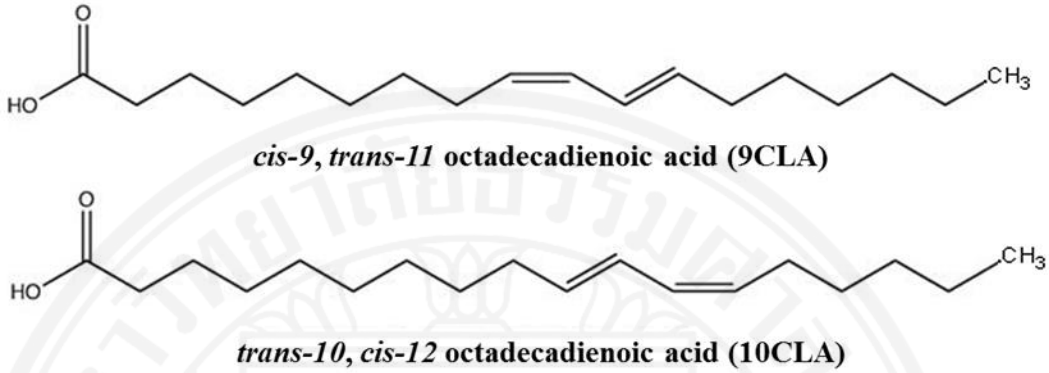
กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก (conjugated linoleic acid, CLA หรือ conjugated octadecaenoic acid) เป็นกลุ่มของกรดไขมันที่มีโครงสร้างเป็นไอโซเมอร์ของกรดไขมันไลโนเลอิก ซึ่งประกอบไปด้วยคาร์บอน 18 อะตอม และมีพันธะคู่ 2 ตำแหน่งภายในโมเลกุลที่จัดเรียงพันธะคู่แบบคอนจูเกต โดยพันธะคู่ทั้ง 2 ตำแหน่ง ห่างกันสองอะตอมคาร์บอน ซึ่งต่างจากกรดไขมันไลโนเลอิก (*cis*-9, *cis*-12 C18:2, Linoleic acid; LA) ทั้งนี้ โครงสร้างแบบคอนจูเกตของ CLA นั้นสามารถพบได้ทั้งในแบบ *cis* หรือ *trans* (*cis* or *trans* configuration) เช่น *cis, cis; cis, trans; trans, cis* และ *trans, trans* (Mulvihill, 2001) โดยตำแหน่งของพันธะคู่นั้นจะพบได้อย่างหลากหลายทั้ง *trans*-6, *trans*-8; *cis*-7, *trans*-9; *trans*-8, *cis*-10; *cis*-9, *trans*-11; *trans*-10, *cis*-12; *cis*-11, *trans*-13 และ *cis*-12, *cis*-14 ซึ่ง CLA ในปัจจุบันที่ถูกค้นพบมีทั้งหมด 28 ไอโซเมอร์ (Collomb และคณะ, 2006) แต่ไอโซเมอร์ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและมีประโยชน์นั้น ได้แก่ *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid (9CLA) และ *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (10CLA) แสดงดังภาพที่ 2-1 โดย 9CLA นั้นมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่ากรดไขมันรูมินิก (ruminic acid) (Kramer และคณะ, 1998) เนื่องจากเชื่อว่าถูกสังเคราะห์ขึ้นในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

CLA ถูกค้นพบโดยบังเอิญ ในปี 1987 โดย Pariza และ Hargraves ซึ่งอ้างถึงใน Park และ Pariza, 2007 โดยคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) กับระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้เนื้อวัวสุก ซึ่งเมื่อพวกเขาทำการสกัดสารที่ได้จากเนื้อวัวหลังการทดลองพบว่ามีคุณสมบัติในการต้านการก่อกลายพันธุ์ (anti-mutagenic activity) ภายหลังได้ทำการตรวจสอบชนิดของสารประกอบที่ได้จึงพบว่าเป็นไอโซเมอร์ของกรดไขมันไลโนเลอิก จึงเรียกกรดไขมันชนิดนี้ว่า CLA

แหล่งของ CLA ส่วนใหญ่มักพบได้ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น น้ำนม ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากน้ำนม และผลิตภัณฑ์เนื้อจากสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น เนื้อโค เนื้อแกะ ซึ่ง CLA ที่พบในสัตว์เคี้ยวเอื้องส่วนใหญ่ มักอยู่ในรูปของ 9CLA (ประมาณ 75-90 เปอร์เซ็นต์ ของ CLA ทั้งหมด) ส่วน 10CLA นั้นพบมากในน้ำมันที่ได้จากพืชบางชนิดเป็นหลัก (Liu และคณะ, 2011)

<u>ภาพที่ 2-1</u>

โครงสร้างทางเคมีของ 9CLA และ 10CLA



2.1.2 ความสำคัญของกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก

CLA มีความสำคัญต่อมนุษย์ในด้านเภสัชศาสตร์ เนื่องจากมีการรายงานว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติในการส่งเสริมสุขภาพหลายประการ เมื่อทดสอบในสัตว์ทดลอง จากงานวิจัยจำนวนมากแสดงให้เห็นว่า CLA มีคุณสมบัติเป็นสารต้านการเกิดมะเร็ง (Ip และคณะ, 1991) ป้องกันโรคเบาหวานหรือช่วยรักษาระดับน้ำตาลในเลือดและอินซูลินให้ปกติ (Houseknecht และคณะ, 1998; Belury และคณะ, 2002) เป็นองค์ประกอบในการสร้างระบบภูมิคุ้มกันที่ช่วยเพิ่มหรือส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Hayak และคณะ, 1999) ป้องกันภาวะหลอดเลือดแดงอุดตัน (Kritchevsky และคณะ, 2002) และมีส่วนช่วยในระบบการเผาผลาญไขมัน (Huang และคณะ, 1994) โดยไอโซเมอร์ส่วนใหญ่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์อยู่ในรูปของ 9CLA และ 10CLA โดย 9CLA นั้นถือได้ว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพหลัก คือเป็นสารต้านการเกิดมะเร็ง เนื่องจากไอโซเมอร์นี้สามารถรวมตัวกับฟอสโฟลิปิด (phospholipids) ที่ผนังเซลล์ได้ซึ่งแตกต่างจากไอโซเมอร์อื่น (อ้อยนภา, 2552) ในขณะที่ 10CLA นั้นจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเผาผลาญไขมันในร่างกายเพื่อให้ได้พลังงาน ลดการสะสมไขมันในเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) โดย 10CLA จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoprotein lipase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่นำส่งไขมันเข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อไขมัน หรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ stearoyl-CoA desaturase ที่เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acids) ซึ่งเป็นกรดไขมันหลักที่จะถูกนำไปเก็บสะสมที่เนื้อเยื่อไขมัน (อ้อยนภา, 2552) และในบางกรณีผลของการส่งเสริมสุขภาพด้านอื่นๆ เกิดจากการทำงานร่วมกันของ 2 ไอโซเมอร์ดังกล่าว

2.1.3 การสังเคราะห์กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก

การสังเคราะห์กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกในปัจจุบันนั้นสามารถทำได้ 2 วิธีหลัก คือ การสังเคราะห์ทางเคมี และการสังเคราะห์โดยอาศัยกระบวนการทางชีวภาพ (อ้อยนภา, 2552) วิธีแรกเป็นการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ปริมาณของ CLA สูง แต่จะมีไอโซเมอร์อื่นที่ไม่ต้องการปะปนในปริมาณมาก ตัวอย่างการสังเคราะห์ CLA โดยกระบวนการไอโซเมอร์ไรเซชันของกรดไขมันลิโนเลอิกในสภาวะด่าง ซึ่งองค์ประกอบของ CLA ที่ผลิตได้แสดงดังตารางที่ 2-1

<u>ตารางที่ 2-1</u>

กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยกระบวนการไอโซเมอร์ไรเซชันของกรดไขมันไลโนเลอิกในสภาวะด่าง

CLA isomers	Concentration (%)	CLA isomers	Concentration (%)	CLA isomers	Concentration (%)
trans, trans		*cis, trans*		*cis, cis*	
12,14	0.37	**12,14**	0.15	**11,13**	0.92
11,13	0.79	**11,13**	22.75	**10,12**	0.59
10,12	1.46	**10,12**	29.60	**9,11**	0.69
9,11	1.20	**9,11**	28.36	**8,10**	0.12
8,10	0.41	**8,10**	12.46		
7,9	0.14				

ที่มา : Yurawecz และคณะ, 1999

จากตารางพบว่ามีการสร้างผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by-product) หรือไอโซเมอร์อื่นๆ ปะปนออกมาในปริมาณมาก ซึ่งบางไอโซเมอร์นั้นเป็นพิษทำให้ CLA ที่ได้ไม่สามารถนำมาใช้ได้โดยตรง (Liu และคณะ, 2011) ต้องนำ CLA ที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ก่อน ทั้งนี้ เนื่องจากค่าใช้จ่ายและปัญหาในการแยกแต่ละไอโซเมอร์ให้บริสุทธิ์นี้เองจึงทำให้ต้องมีการพัฒนาวิธีการใหม่ๆ ขึ้นมา และวิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจคือการใช้วิธีทางชีวภาพด้วยการใช้แบคทีเรียในการผลิต

การสังเคราะห์ CLA วิธีที่ 2 คือการสังเคราะห์ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยพบการสังเคราะห์ CLA ในกระเพาะหมักหรือภายในเนื้อเยื่อของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ผ่านกระบวนการไบโอไฮโดรจีเนชั่น (biohydrogenation) ของกรดไขมันไลโนเลอิก ซึ่งเป็นกรดไขมันที่พบอยู่ในหญ้า การสังเคราะห์ CLA ในกระเพาะหมักนั้นเกิดจากแบคทีเรียที่เจริญได้เฉพาะในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

(anaerobic bacteria) ซึ่งพบว่า *Butyrivibrio fibrisolvens* เป็นแบคทีเรียกลุ่ม anaerobe ที่แยกได้จากกระเพาะอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดแรกที่พบว่ามีความสามารถในผลิต CLA (9CLA และ 10CLA) ได้ (Kepler และคณะ, 1966) หลังจากนั้นมีการรายงานว่าไม่ได้มีเฉพาะแบคทีเรียจากกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องเท่านั้นที่สามารถผลิต CLA ได้ แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์นม มนุษย์ และจากลำไส้เล็กของสัตว์ก็เป็นแบคทีเรียที่ได้รับการยืนยันแล้วว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้าง CLA ได้ หรือ CLA-producing bacteria ซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) สายพันธุ์ต่างๆ ปัจจุบันพบว่า *Lactobacillus reuteri, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis, Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis, Propionibaterium freudenrehichii, Bifidobacterium* sp. และ *Streptococcus* sp. ก็สามารถผลิต CLA ได้เช่นกัน (Kim และ Liu, 2002 ; Van Nieuwenhove และคณะ, 2007; Chung และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่า CLA ยังสามารถสังเคราะห์ขึ้นภายในเนื้อเยื่อของสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยอาศัยกระบวนการเติมพันธะคู่ให้แก่กรดไขมัน (desaturation) ซึ่ง CLA จะถูกสะสมที่ต่อมสร้างน้ำนม และเนื้อเยื้อไขมันของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Corl และคณะ, 2001)

2.2 แบคทีเรียกรดแลคติก

2.2.1 ลักษณะทั่วไป

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) จัดเป็นพวกโพรคาริโอต (Procaryotes) อยู่ในโดเมนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปร่างกลมหรือท่อน ทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้ ไม่สร้างสปอร์ ปกติไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยส่วนใหญ่ไม่สามารถหายใจโดยใช้ออกซิเจน แต่มีบางสายพันธุ์สามารถทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจน (aero-tolerant) เป็นแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารที่สมบูรณ์ในการเจริญเติบโต สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมอื่นๆ ได้โดยสร้างเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ออกมา จากชนิดและปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เชื้อผลิตได้สามารถจัดแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มฮอมอเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) และกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) โดยกลุ่มแรกสามารถผลิตกรดแลคติกจากการหมักน้ำตาลได้สูงประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลืออีก 5 เปอร์เซ็นต์จะผลิตกรดแอซีติก (acetic acid) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เล็กน้อย สำหรับแบคทีเรียกลุ่มหลังภายหลังจากการการหมักน้ำตาลแล้วจะผลิตกรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และอีก 50 เปอร์เซ็นต์ ผลิตกรดแอซีติก กรดฟอร์มิก (formic acid) รวมทั้งเอทานอล (ethanol) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (บุษกร, 2547; Frazier และคณะ, 1988; Jay และคณะ, 2000) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลที่มีการรายงานว่าสามารถผลิต CLA จากกรดไขมันไลโนเลอิก หรือกรดไขมันไรซิโนเล

อิกได้แก่ สกุล *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* และ *Pediococcus* (Holt และคณะ, 1994; บุษกร, 2548)

2.2.2 บทบาทในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก

แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญในการผลิต CLA เนื่องจากมีคุณสมบัติที่สำคัญและเหมาะสมในการมาใช้ในการผลิต เช่น เป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค (generally regarded as safe, GRAS) จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียสำหรับอาหาร (food-grade bacteria) ซึ่งเหมาะสมในการนำมาศึกษาเพื่อใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ใช้กับมนุษย์ และยังมีการวิจัยต่างๆ ค้นพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกนี้สามารถผลิต CLA โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactobacillus* (ตารางที่ 2-2)

ตารางที่ 2-2

การผลิต CLA จากแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactobacillus* ในสภาวะที่มีการเสริมกรดไขมันไลโนเลอิก

Strains	*c*9,*t*11	*t*10,*c*12	Other isomer	LA conversion (%)	References
L. curvatus	+	+	–	1.6	Gorissen *et al.,* 2011
L. plantarum	+	+	–	4.6	Gorissen *et al.,* 2011
	+	–	+	N.D	Kishino *et al.,* 2002
	+	+	-	N.D	Ogawa *et al*., 2005
	+	+	–	N.D	Rodríguez-Alcalá *et al*., 2011
	+	+	–	N.D	Xu *et al*., 2004
L. sakei	+	+	–	4.2	Gorissen *et al.,* 2011
L. reuteri	+	+	–	26	Lee *et al*., 2003
L. rhamnosus	+	+	–		Lee *et al*., 2006
	+	+	–		Ogawa *et al*., 2005
	+	–	–	34	Van Nieuwenhove *et al*., 2007
L. paracasei	+	–	–	N.D	Lee *et al*., 2006
L. pentosus	+	+	–	N.D	Lee *et al*., 2006
	+	+	–		Ogawa *et al*., 2005
L. brevis	+	+	–	N.D	Ogawa *et al*., 2005
L. curvatus	+	+	–	1.6	Gorissen *et al*., 2011

ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

การผลิต CLA จากแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactobacillus* ในสภาวะที่มีการเสริมกรดไขมันไลโนเลอิก

Strains	*c*9,*t*11	*t*10,*c*12	Other isomer	LA conversion (%)	References
L. acidophilus	+	–	–	20	Van Nieuwenhove *et al*., 2007
	+	+	–	N.D	Ogawa *et al*., 2005
	+	+	–	N.D	Xu *et al*., 2004
L. renteri	N.I	N.I	–	26	Lee *et al*., 2003

หมายเหตุ : + คือมีการผลิต, – คือ ไม่มีการผลิต, N.D คือ ไม่ได้วิเคราะห์, N.I คือ ไม่มีข้อมูล

ดัดแปลงจาก Van Nieuwenhove และคณะ, 2012

ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Lactobacillus* นี้สามารถผลิต CLA ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง (ตารางที่ 2-3) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สิ่งมีชีวิตอื่นหรือการใช้วิธีการสังเคราะห์อื่นๆ อีกทั้งยังให้ไอโซเมอร์ที่ต้องการในปริมาณมาก โดยเฉพาะที่อยู่ในรูปของ 9CLA (ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้าบางงานวิจัยจะกล่าวรวมผลการผลิต 9CLA ที่ได้คือผลรวมของ 9CLA ทั้งสองไอโซเมอร์ (9CLA-1 และ 9CLA-2)) และ 10CLA เป็นหลัก

ตารางที่ 2-3

ปริมาณการผลิต CLA โดยแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactobacillus*

Strains	Reaction method[a] /Substrate[b]	CLA isomers (%)			Productivity (mg/L)
		cis-9,*trans*-11	*trans*-9,*trans*-11	*trans*-10-*cis*-12	
L. acidophilus	c/LA	85	5	10	131
L. casei	c/LA	85	3	12	111
L. acidophilus	r/LA	67	33	-	4,900
L. plantarum	r/LA	38	62	-	40,000
L. plantarum	r/RA	21	79	-	2,400
L. plantarum	r/CO	26	74	-	2,700
L. reuteri	r/LA	59	41	-	300

หมายเหตุ : [a] หมายถึง c คือ cultivation; r คือ resting cell reaction

[b] หมายถึง LA คือ linoleic acid; RA คือ ricinoleic acid; CO คือ castor oil

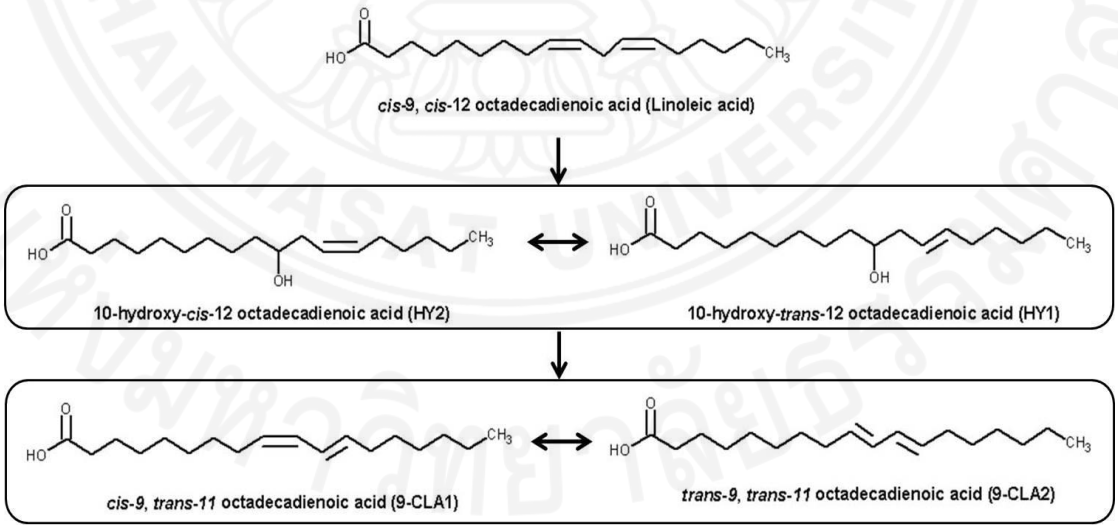
ดัดแปลงจาก Ogawa และคณะ, 2005

ส่วนใหญ่แบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิต CLA ได้จากกรดไขมันไลโนเลอิกเป็นหลัก โดยอาศัยกระบวนการไอโซเมอร์ไรเซชันของกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็น CLA ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไลโนเลเอทไอโซเมอร์เรสที่แบคทีเรียสร้างขึ้น โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น คือ LA ในรูปอิสระจะถูกเปลี่ยนเป็น 10-Hydroxy 18:1 ด้วยปฏิกิริยาการเติมน้ำ หลังจากนั้น 10-Hydroxy 18:1 จะถูกเปลี่ยนเป็น 9CLA ในรูปไอโซเมอร์ 9CLA-1 และ 9CLA-2 หรือ 9CLA ไอโซเมอร์ *cis, trans* และ *trans, trans* ด้วยปฏิกิริยาการกำจัดน้ำออก ดังแสดงในภาพที่ 2-2

นอกจากแบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิต CLA ได้จากกรดไขมันไลโนเลอิกแล้วยังมีแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ เช่น *L. plantarum* (Ando และคณะ, 2004) ที่สามารถผลิต CLA ได้จากกรดไขมันไรซิโนเลอิก (Ricinoleic acid, RA, 12-Hydroxy-*cis*-9-18:1) ซึ่งจะอาศัยเอนไซม์ไลโนเลเอทไอโซเมอร์เรสที่แบคทีเรียสร้างเช่นเดียวกัน โดยกระบวนการเกิดปฏิกิริยาจะอาศัย 2 กลไกหลักคือ 1) การเปลี่ยน RA ให้เป็น CLA โดยตรง และ 2) การเปลี่ยน RA ไปเป็น LA และเปลี่ยนไปเป็น CLA ดังแสดงในรูปที่ 2-3

<u>ภาพที่ 2-2</u>

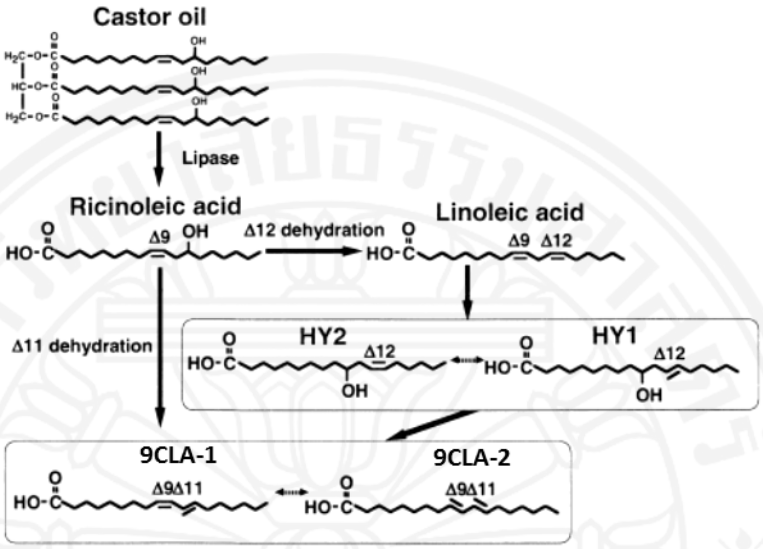
ตัวอย่างกระบวนการเปลี่ยนกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็น CLA ของ *L. plantarum*



ดัดแปลงจาก Ogawa และคณะ, 2005

<u>ภาพที่ 2-3</u>

กระบวนการเปลี่ยนกรดไขมันไรซิโนเลอิกไปเป็น CLA ของ *L. plantarum*



ที่มา : Ogawa และคณะ, 2005

2.2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการผลิต CLA จากแบคทีเรียกรดแลคติก

Kishino และคณะ (2003) รายงานว่า *L. plantarum* AKU 1009a เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต CLA (CLA-producing bacteria) ผ่านสองปฏิกิริยาหลักโดยปฏิกิริยาแรก คือ ปฏิกิริยาการเติมน้ำ (hydration) ใน LA ให้เปลี่ยนเป็น 10-Hydroxy-18:1 และปฏิกิริยาที่สอง ปฏิกิริยาการกำจัดน้ำออก (dehydration) เปลี่ยน hydroxyl acid เป็น CLA โดยสายพันธุ์นี้สามารถสร้าง CLA ได้ทั้งในรูป *c*9, *t*11 (9CLA) และ *t*10, *c*12 (10CLA)

Xu และคณะ (2004) ได้รายงานเหมือนกันว่าการผลิต CLA จากแบคทีเรียกรดแลคติก และ Propionibacteria ที่เพาะเลี้ยงในไขมันนม (fat milk) ที่มีการเติมน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านการไฮโดรไลซ์เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง ให้ผลอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ CLA ในรูป 9CLA และ 10CLA ที่แตกต่างกัน โดยในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้ *L. acidophilus*, *L. casei, L. plantarum*, *Enterococcus faecium*, *L. rhamnosus, Pediococcus acidilactici* และ จุลินทรีย์ในกลุ่มผลิตโยเกิร์ต (กล้าเชื้อผสมอัตราส่วน 1:1 ระหว่าง *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* และ *Streptococcus salivarius*) มีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต CLA ในสภาวะการเพาะเลี้ยงในไขมันนมเช่นกัน แต่การเพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจาก 24 ชั่วโมง เป็น 48 ชั่วโมง ไม่ได้ช่วยส่งเสริมให้ความเข้มข้นของ CLA เพิ่มขึ้น ยกเว้นสายพันธุ์ *Ped. acidilactici* และ *L.*

rhamnosus โดยพบว่าไอโซเมอร์หลักที่ผลิตได้เมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คือ 9CLA รองลงมาคือ 10CLA ยกเว้นสายพันธุ์ *E. faecium* ที่ไม่พบการผลิต 10CLA

Lee และคณะ (2006) รายงานว่าสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก Lactobacilli ที่คัดแยกได้จากมนุษย์มีความสามารถในการผลิต CLA ได้ โดยทำการศึกษาการผลิต CLA จากแบคทีเรียกรดแลคติก Lactobacillus สกุลต่างๆ ได้แก่ *L. rhamnosus*, *L. paracasei* และ *L. pentosus* พบว่าทั้งสามสกุลมีการผลิตไอโซเมอร์ของ CLA ได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ซึ่ง *L. rhamnosus* และ *L. pentosus* สามารถเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA ได้ทั้งรูปไอโซเมอร์ 9CLA และ 10CLA แต่ *L. paracasei* ผลิตเฉพาะไอโซเมอร์ 9CLA เท่านั้น

Van Nieuwenhove และคณะ (2007) ศึกษาการผลิต CLA จากแบคทีเรียกรดแลคติก 6 สายพันธุ์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า *L. casei*, *L. rhamnosus* และ *S. thermophilus* แสดงค่าการเปลี่ยน LA ได้สูงที่สุดในอาหารเหลว de Man Rogosa Sharpe (MRS) มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA (LA conversion) ที่ 17 เปอร์เซ็นต์ และ 36 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลการเปลี่ยน LA เพิ่มมากขึ้นสองถึงสามเท่าเมื่อเพาะเลี้ยงในนม *S. thermophilus* จึงมีความสำคัญในการนำมาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมักสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์จากนม (dairy products)

ผู้วิจัยบางท่านได้รายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์เชิงบวก (positive correlation) ระหว่างการผลิต CLA และการทนต่อ LA เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน (Van Nieuwenhove และคณะ, 2007; Xu และคณะ, 2008) พบว่าประสิทธิภาพของการผลิต CLA ในแบคทีเรียกรดแลคติก Bifidobacterium นั้นจะลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิกที่สูงขึ้น

การศึกษาของ Rodríguez-Alcalá และคณะ (2011) เมื่อใช้แบคทีเรียกรดแลคติก *L. acidophilus*, *L. plantarum* และ *Lactococcus lactis* ในการผลิต CLA พบว่าสามารถผลิตไอโซเมอร์หลักคือ *c*9, *t*11 (9CLA หรือ 9CLA ไอโซเมอร์ที่ 1; 9CLA-1) ได้ 60-65 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ CLA ทั้งหมด รองลงมาคือ *t*10, *c*12 (10CLA) ได้ 30-32 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ CLA ทั้งหมด และผลิตไอโซเมอร์รอง เช่น *t*9, *t*11 (9CLA ไอโซเมอร์ที่ 2; 9CLA-2) และ *t*10, *t*12 (2-5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ CLA ทั้งหมด) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS และ skim milk เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Chin และคณะ (1992) ศึกษาการผลิต CLA จากแบคทีเรีย Propionibacteria ซึ่ง CLA ที่ผลิตได้มีหลายไอโซเมอร์ โดยเมื่อผลิตแล้วพบว่า CLA จะถูกปลดปล่อยออกนอกเซลล์ ทั้งนี้พบว่าสามารถผลิตไอโซเมอร์ 9CLA-1 และ 9CLA-2 ได้มากถึง 70-90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ CLA ทั้งหมดที่ผลิตได้ และพบสัดส่วนการผลิต CLA ที่คล้ายๆ กันเมื่อมีการเพาะเลี้ยงเชื้อนี้ในนม

การศึกษาของ Jiang และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 19 สายพันธุ์ ได้แก่ Lactobacilli, Lactococci, Streptococci และ Propionibacteria ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์นมมาทำการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกในอาหาร MRS ที่มีแปรผันความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิกที่ 0, 10, 50, 100, 200, 500, 750 และ 1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในหลอดทดลอง พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสองสายพันธุ์ คือ *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* และ *P. freudenreichii* ssp. *sheramnii* มีความสามารถในการเปลี่ยน LA เป็น CLA ได้ โดยความเข้มข้นของ CLA ที่ผลิตได้สูงสุดในอาหารเท่ากับ 265 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลผลิตที่ได้เป็นไอโซเมอร์ 9CLA-1 มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณของ CLA ทั้งหมด

Lin และคณะ (1999) ได้ทำเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก 6 สายพันธุ์ ในอาหาร MRS โดยศึกษาผลของการเติม LA ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1000 และ 5000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนาน 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าการผลิต CLA จะเกิดขึ้นได้เมื่อมีการเติม LA โดย *L. acidophilus* (CCRC14079) สามารถผลิต CLA ได้สูงสุด 105.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในหางนมที่มีความเข้มข้นของ LA เท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมการสร้าง CLA ทั้งนี้ การเติม LA ที่ความเข้มข้นมากขึ้นจาก 1000 เป็น 5000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการเพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจาก 24 ชั่วโมง เป็น 48 ชั่วโมง ไม่พบการเพิ่มขึ้นของ CLA

Lin และคณะ (2004) ศึกษาการผลิต CLA โดยใช้เซลล์ตรึงรูปของแบคทีเรียกรดแลคติก *L.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* และ *L. acidophilus* โดยใช้วัสดุตรึงรูปคือ ไคโตซานและโพลีอะครีลาไมด์ที่ผสมกับกรดไขมันไลโนเลอิก ทำการศึกษาการแปรผันค่าพีเอชเท่ากับ 5, 6, 7 และ 8 พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้มากขึ้นทำให้สามารถผลิต CLA ได้มากขึ้น โดย *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ที่ตรึงรูปด้วยโพลีอะครีลาไมด์ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7 ให้ค่าการผลิต CLA ที่ดีขึ้นกว่าการไม่ทำเซลล์ตรึงรูป จากผลการวิจัยพบว่าการตรึงรูปเซลล์ช่วยเพิ่มศักยภาพในการผลิต CLA ได้เพิ่มมากขึ้น

L. delbrueckii ssp. *bulgaricus* ที่ตรึงรูปด้วยโพลีอะครีลาไมด์ สามารถผลิต CLA ทั้งหมดได้สูงสุดที่เท่ากับ 121 ไมโครกรัม ที่พีเอช 7 รองลงมาคือเซลล์ที่ตรึงรูปด้วยไคโตซาน ให้ผลผลิต CLA เท่ากับ 84.3 ไมโครกรัม ที่พีเอช 8 และเซลล์ที่ไม่ได้ตรึงรูปให้ผลผลิต CLA เท่ากับ 29.4 ไมโครกรัม และมีการรายงานผลการทดลองที่คล้ายกันในการตรึงรูปเซลล์ *L. acidophilus* พบว่าเซลล์ *L. acidophilus* ที่ตรึงรูปด้วยโพลีอะครีลาไมด์ ให้ผลผลิต CLA สูงที่สุด (218 ไมโครกรัม) ที่พีเอช 7 รองลงมาคือ เซลล์ที่ตรึงรูปด้วยไคโตซาน (55.5 ไมโครกรัม) และเซลล์ที่ไม่ตรึงรูป (22.0 ไมโครกรัม) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการตรึงรูปเซลล์ช่วยเพิ่มการผลิต CLA ซึ่ง *L.*

acidophilus ที่ตรึงรูปด้วยโพลีอะครีลาไมด์นั้นผลิต 9CLA-1 และ 9CLA-2 ได้เป็นไอโซเมอร์หลัก ซึ่งขัดแย้งกับบางงานวิจัยที่เพาะเลี้ยง *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* และ *L. acidophilus* เช่นเดียวกันโดยทำการเพาะเลี้ยงแบบธรรมดาและแบบล้างเซลล์ และพบว่าผลผลิต CLA ที่ได้มีมากกว่าการผลิต CLA ที่ใช้เซลล์ตรึงรูป (Kishino และคณะ, 2002; Jiang และคณะ, 1998)

Choi และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผลของพีเอชและออกซิเจนต่อการผลิต CLA โดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่ได้จากกระเพาะหมักของวัวมาเพาะเลี้ยงในอาหาร rumen fluid (rumen fluid medium) ที่มีความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน และแปรผันค่าพีเอชที่ 5.6-6.8 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในหลอดทดลอง ผลการแปรผันค่าพีเอชพบว่าปริมาณการสร้าง 10CLA จะสูงกว่า 9CLA ในช่วงที่พีเอชต่ำกว่า 6.0 และเมื่อพีเอชสูงขึ้นจะผลิต 10CLA ได้เพียงเล็กน้อย ในทางกลับกันสัดส่วนของ 9CLA จะมากขึ้นในอาหารที่พีเอชสูงขึ้นโดยจะพบไอโซเมอร์ 9CLA-1 มากกว่า 90% เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชมากกว่า 6.3 ส่วนผลของสภาวะการมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนต่อการผลิต CLA จากแบคทีเรียกระเพาะหมัก ในอาหาร rumen fluid ที่มี LA 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6.3 และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ที่พีเอชนี้สามารถเห็นความแตกต่างในการผลิตไอโซเมอร์ CLA ได้ดีที่สุด) พบว่าความเข้มข้นของ 9CLA-1 ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะสูงกว่าในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 1 ชั่วโมง ไอโซเมอร์ 9CLA-1 จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนและเพิ่มขึ้นมากกว่า 3 เท่าของ 9CLA-1 ที่ผลิตได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และจะไม่ผลิตเพิ่มขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงไป 6 ชั่วโมง ในขณะที่ 10CLA จะเริ่มผลิตหลังจากทำการเพาะเลี้ยงไปแล้ว 6 ชั่วโมง โดยจะสามารถผลิต 10CLA เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนผลิตมากกว่า 9CLA-1 เมื่อครบระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ 12 ชั่วโมง

การศึกษาของ Chen และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ไลโนเลเอทไอโซเมอเรส Linoleate isomerase (LAI, EC 5.2.1.5) จาก *L. plantarum* ZS2058 ซึ่งคัดแยกได้จากผักดองของจีนและมีความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกได้สูง ผู้วิจัยได้ทำการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ Linoleate isomerase (LAI) โดยทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าโปรตีนมีมวลโมเลกุล 66 kDa เมื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์แล้วเอนไซม์สามารถทำงานได้โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (specific activity) 3.71 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนในหนึ่งนาที และมีค่า K_m 21.5 ไมโครโมลาร์ ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 6.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส โดยการทำงานของเอนไซม์ LAI ไม่จำเป็นต้องใช้ cofactor หรือแหล่งพลังงานอื่นๆ มาช่วยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก

2.3.1 ปัจจัยเนื่องจากสายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต CLA หรือเรียกว่า CLA-producing bacteria ในแต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการผลิตที่แตกต่างกันไปเช่น มีผลต่อการสร้างไอโซเมอร์ของ CLA ที่แตกต่างกันจากการศึกษาของ Lee และคณะ (2006) ทดสอบการผลิต CLA จากแบคทีเรียกรดแลคติก Lactobacilli ที่คัดแยกได้จากมนุษย์ พบว่าแบคทีเรียต่างสายพันธุ์กันให้ผลผลิตในไอโซเมอร์ที่แตกต่างกัน โดย *L. rhamnosus* และ *L. pantosus* สามารถผลิตได้ทั้ง 9CLA และ 10CLA ในขณะที่ *L. paracasei* สามารถผลิต 9CLA ได้เพียงไอโซเมอร์เดียว และความสามารถในการเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์หรือ LA ไปเป็น CLA (LA conversion (%)) มีค่าแตกต่างกันตามความสามารถของแต่ละสายพันธุ์ คือ *B. breve* (65%), *S. thermophilus* (33%), *L. reuteri* (26%), *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (78%) (Coakley และคณะ, 2003; Lee และคณะ, 2003; Oh และคณะ, 2003; Van Nieuwenhove และคณะ, 2007)

2.3.2. ปัจจัยเนื่องจากความเข้มข้นของสับสเตรทหรือกรดไขมันไลโนเลอิก

ความเข้มข้นของสารตั้งต้นนั้นจะมีผลต่อการผลิต CLA และเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทหรือ LA นี้จะมีผลทำให้มีการผลิต CLA ได้เพิ่มขึ้นแต่ในทางกลับกันการเจริญเติบโตของเซลล์จะลดลงเนื่องมาจากความเป็นพิษของกรดไขมันไลโนเลอิก จากการศึกษาของ Zhang และคณะ (2013) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ LA จะส่งผลให้การผลิต CLA ค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ LA ที่เพิ่มแต่มีผลทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable plate count) มีค่าลดลง

2.3.3. ชนิดของอาหารและสับสเตรท

สายพันธุ์ที่ต่างกันมีความสามารถในการใช้อาหารได้แตกต่างกัน โดยอาหารที่ใช้ในการผลิต CLA นั้นจำเป็นต้องมีการเติมสับสเตรทหรือ LA เป็นส่วนประกอบในอาหารด้วย เนื่องจากการศึกษาของ Lin และคณะ (1999) ได้พบว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ไม่มีการเติมกรดไขมันไลโนเลอิกจะผลิต CLA ได้น้อยหรือไม่มีผลิต การเติมสับสเตรทจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญมากในการผลิต แต่ต้องคำนึงถึงปริมาณของสับสเตรทที่ใช้ด้วยเพราะ LA ที่เข้มข้นมากจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียได้ จากงานวิจัยต่างๆ พบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้อาหารประเภทน้ำนม ผลิตภัณฑ์จากน้ำนม หางนม อาหาร MRS และอาหาร MRS ที่มีการเติมกรดอะมิโนหรือธาตุอาหารชนิดอื่นๆ ลงไปตามความเหมาะสมของสายพันธุ์ที่เลือกใช้ในการผลิต เช่น

การทดลองของ Alonso และคณะ (2003) ซึ่งทดสอบการผลิต CLA ของแบคทีเรีย *L. acidophilus* และ *L. casei* ที่แยกได้จากลำไส้ของมนุษย์ในอาหารสองชนิด คือ อาหาร MRS และหางนมที่มีการเติมกรดไขมันไลโนเลอิก 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอาหารทั้งสองชนิดสามารถผลิต CLA (9CLA-1; 10CLA; 9CLA-2) ได้ปริมาณใกล้เคียงกัน โดยในอาหาร MRS แบคทีเรีย *L. acidophilus* L1 สามารถผลิต 9CLA-1 ได้สูงสุด 115.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผลิต CLA ทั้งหมดได้สูงสุด 131.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทดสอบเลี้ยงในหางนมจะผลิต 9CLA-1 ได้สูงสุด 100.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผลิต CLA ทั้งหมดได้สูงสุด 116.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นอกจากการใช้กรดไขมันไลโนเลอิกเป็นสับสเตรทแล้วแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ยังสามารถใช้กรดไขมันชนิดอื่นในการผลิต CLA ได้ เช่น กรดไขมันไรซิโนเลอิก (Ricinolenic acid, RA, 12-Hydroxy-*cis*-9-18:1) และน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ที่มีปริมาณ LA สูง เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันคาโนลา น้ำมันเมล็ดละหุ่ง น้ำมันดอกคำฝอย และน้ำมันเมล็ดฝ้าย เป็นต้น โดยกรดไขมันที่จะนำมาใช้เป็นสับสเตรทต้องอยู่ในรูปกรดไขมันอิสระเท่านั้น (Kishino และคณะ, 2002)

2.3.4. ค่าพีเอช

ค่าพีเอชที่เหมาะสมมีความสำคัญต่อการผลิต CLA อย่างยิ่ง โดยเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลโนเลเอทไอโซเมอเรส (Linoleate isomerase : LAI) ที่มีหน้าที่ในการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA จากการศึกษาของ Kepler และ Tove (1967) ซึ่งศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ LAI ของแบคทีเรีย *B. fibrisolvens* พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมของ *B. fibrisolvens* อยู่ในช่วงพีเอช 7.0-7.2 แต่ช่วงพีเอชที่เอนไซม์ LAI ทำงานได้นั้นอยู่ในช่วงที่กว้าง จากพีเอช 5.5-8.5 (Kim และคณะ, 2000) จากการศึกษาของ Pariza และ Yang (1999) ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิต CLA จากสารแขวนลอยเซลล์ *L. reuteri* อยู่ในช่วง 7.4-8.8

2.3.5. อุณหภูมิ

การผลิต CLA จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น (25-40 องศาเซลเซียส) การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิอาจจะมีความสัมพันธ์ต่อลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จากการศึกษาของ Mansilla และคณะ, (2004) และ Kanduser และคณะ, (2008) รายงานว่าอุณหภูมิเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่ช่วยเพิ่มการไหล (fluidity) และการเลือกผ่าน/แพร่ผ่าน (permeability) ได้มากขึ้น ทำให้เอนไซม์ LAI ที่มีหน้าที่ในการเปลี่ยน LA ให้เป็น CLA ในรูปไอโซเมอร์ 9CLA-1 ได้สูงขึ้น การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมินอกจากมีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์และการเจริญเติบโตของเซลล์แล้ว ยังอาจ

มีผลต่อการกระจายตัวและโครงสร้างของ LA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Zhang และคณะ, 2013) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง LA ไปเป็น CLA ได้ง่ายหรือยากขึ้น

2.3.6. ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ จากรายงานวิจัยของ Alonso และคณะ (2003) มีการยืนยันว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจะเริ่มผลิต CLA เมื่อเซลล์เจริญอยู่ในระยะสุดท้ายของการเพิ่มจำนวน (late log phase) จนถึงระยะคงที่ (stationary phase) ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต้องขึ้นกับแบคทีเรียตามระยะการเจริญเติบโต ซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่มีรายงานตรงกันหลายครั้งในเรื่องการเพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง เมื่อทำการเพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแล้วไม่สามารถเพิ่มปริมาณการผลิต CLA โดยระยะเวลาที่ยาวนานเกินไปอาจส่งผลทำให้ปริมาณ 9CLA-1 ที่ผลิตได้ลดลงหรือเปลี่ยนรูปไอโซเมอร์ไปเป็น 9CLA-2 หรือเป็นสารตั้งต้นตัวใหม่ให้เชื้อผลิต CLA ไอโซเมอร์อื่นๆ แทน (Gorissen และคณะ, 2011)

2.3.7. ออกซิเจนหรือการให้อากาศ

Kishino และคณะ (2002) และ Macouzet และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณออกซิเจนต่อการผลิต CLA พบว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic) หรือมีออกซิเจนน้อยกว่าร้อยละ 3-5 (microaerobic) หรือไม่มีออกซิเจน (anaerobic) นั้นจะไม่ส่งผลต่อปริมาณการผลิต CLA แต่จะส่งผลต่อโครงสร้างทางไอโซเมอร์ของ CLA โดยปริมาณแต่ละไอโซเมอร์ที่ผลิตได้ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีออกซิเจนเล็กน้อยและไม่มีออกซิเจนจะผลิต CLA ในรูปไอโซเมอร์ 9CLA-2 ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะมีออกซิเจนปกติ

จากการผลิตไอโซเมอร์ของ CLA ที่แตกต่างกันในสภาวะการมีและไม่มีออกซิเจนส่งผลต่อการผลิต 9CLA-2 (*trans-9, trans*-11 CLA) มากกว่า 9CLA-1 หรือให้การผลิตกรดไขมันในรูปไขมันทรานส์ (*trans* fatty acid (TFAs)) ที่มากกว่า จึงเกิดข้อสงสัยเกี่ยวกับผลเสียหรือประโยชน์ของกรดไขมันในรูปทรานส์หรือไอโซเมอร์ 9CLA-2 มากขึ้น โดยจากการศึกษาของ Park (2009) รายงานว่า 9CLA-2 เป็นกรดไขมันทรานส์แบบ conjugated TFAs ที่ไม่มีรายงานถึงผลเสียต่อร่างกายเหมือนกรดไขมันทรานส์แบบ non-conjugated TFAs หรือไขมันทรานส์ที่ได้จากเนื้อสัตว์เคี้ยวเอื้อง (ruminant TFAs) และน้ำมันพืชที่เติมไฮโดรเจน (industrial TFAs) ที่ส่งผลต่อระดับคลอเรสเตอรอลชนิดไม่ดีหรือ Low Density Lipoprotein Cholesterol (LDL) ในร่างกายเพิ่มขึ้นและก่อให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (Willett และคณะ, 1993; Lichtenstein และคณะ, 1999) โดยมีรายงานถึงคุณสมบัติทางชีวภาพของ 9CLA-2 ว่ามีสมบัติเป็นสารต้านการจับกลุ่มของเกล็ดเลือด (inhibits

platelet aggregation) (Al-Madaney และคณะ, 2003 และ Li และคณะ, 2005) และมีสมบัติต้านการเติบโตของเซลล์(มะเร็ง) (antiproliferative effect) (Lai และคณะ, 2005) แต่รายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติของไอโซเมอร์ 9CLA-2 กลับพบไม่มากเท่ากับงานวิจัยของ 9CLA (9CLA-1) และ 10CLA ที่มีงานวิจัยออกมายืนยันถึงคุณสมบัติทางชีวภาพที่มีประโยชน์อย่างชัดเจนหลายฉบับ จึงทำให้การศึกษาส่วนใหญ่มุ่งเน้นศึกษาการผลิต 9CLA (9CLA-1) และ 10CLA หรือสภาวะที่ให้ปริมาณไอโซเมอร์ 9CLA-1 ได้สูงจึงมีความสำคัญหรือเป็นที่สนใจมากกว่าการผลิต 9CLA-2 ได้สูง แต่งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิต CLA จากแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่มีความสามารถในการผลิต 9CLA ได้มากกว่า 10CLA รวมถึงความปลอดภัยของกรดไขมันทรานส์แบบ conjugated TFAs และการมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ของ 9CLA-2 การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษาสภาวะการผลิตที่ให้ผลผลิต 9CLA (9CLA-1, 9CLA-2) ที่สูงหรือสนใจศึกษาการผลิต 9CLA ทั้งสองไอโซเมอร์

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และไอโซเลตจุลินทรีย์

3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร พร้อมชุดควบคุม รุ่น Biostat® B plus twin (Satorius Stedim Biotech; Germany)

2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Biochrom Libra S22 UV-visible, England)

3. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter, PSI 50 bench top pH meter, Beckman; Germany)

4. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker, Innova 4230, New Brunswick Scientific; USA)

5. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Microfuge 16, Beckman coulter; Germany)

6. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) รุ่น GCMS-PQ2010 Ultra (SHIMADZU; Japan)

7. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow, Microflow, Bioquell UK Ltd; United Kingdom)

8. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert; Germany)

9. ตู้ดูดความชื้น (Dessicator, Weifo Dry-60; Taiwan)

10. อ่างคลื่นความถี่สูง (Benchtop ultrasonics cleaner, 575HT, CREST ULTRASONICS; USA)

11. เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับงานด้านจุลชีววิทยา

12. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร de Man Rogosa Sharp (MRS) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย $C_6H_{12}O_6$ 20 กรัม beef extract 10 กรัม meat peptone 10 กรัม yeast extract 5 กรัม $C_2H_3NaO_2$ 5 กรัม Na_2HPO_3 2 กรัม $C_6H_{17}N_3O_7$ 2 กรัม Tween 80 1 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 กรัม และ $MnSO_4.H_2O$

0.05 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที

อาหาร Modified Man Rogosa Sharp (Modified MRS : MMRS) ที่ดัดแปลงจากสูตรอาหาร MRS (Man และคณะ, 1960) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย $C_6H_{12}O_6$ 20 กรัม meat peptone 10 กรัม yeast extract 5 กรัม $C_2H_3NaO_2$ 5 กรัม Na_2HPO_3 2 กรัม $C_6H_{17}N_3O_7$ 2 กรัม Tween 80 1 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 กรัม และ $MnSO_4.H_2O$ 0.05 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที (พีเอช 6.7)

ในกรณีอาหารแข็งเติมผงวุ้น 20 กรัม และสำหรับการเตรียมอาหารที่มี $CaCO_3$ เป็นองค์ประกอบ ให้เติมหลังจากทำให้ปลอดเชื้อแล้ว

3.1.3 ไอโซเลตจุลินทรีย์และการเก็บรักษา

แบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่ใช้ในการศึกษามีจำนวน 44 ไอโซเลต คัดแยกได้จากอาหารหมักของไทย ได้แก่ หม่ำหมู (4 ไอโซเลต), หม่ำเนื้อ (9 ไอโซเลต), ไส้กรอกอีสานหมู (13 ไอโซเลต), ไส้กรอกอีสานเนื้อ (3 ไอโซเลต), ผักเสี้ยนดอง (6 ไอโซเลต), หัวหอมดอง (3 ไอโซเลต), กะหล่ำปลีดอง (2 ไอโซเลต), ผักกาดดอง (1 ไอโซเลต), กะปิ (2 ไอโซเลต) และกุ้งจ่อม (1 ไอโซเลต) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ไอโซเลตจุลินทรีย์จากหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

การเก็บรักษาไอโซเลต *L. plantarum* ทำโดยเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารแข็งชนิด MRS จำนวน 5 จานเพาะเชื้อต่อหนึ่งไอโซเลต เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นชะโคโลนีของ *L. plantarum* ที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็งด้วยอาหารเหลว MRS ที่มีสารละลายกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บสารแขวนลอยเซลล์ และแบ่งใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร และเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการเตรียมกล้าเชื้อต่อไป

3.2 การเตรียมสับสเตรทกรดไขมันไลโนเลอิกและน้ำมันถั่วเหลือง

3.2.1 กรดไขมันไลโนเลอิก

กรดไขมันไลโนเลอิก (LA) ที่ใช้เป็นสับสเทรตในการศึกษาการผลิต CLA ของ *L. plantarum* ที่ใช้ในการทดลองนี้ทำการเตรียมในรูปอิมัลชั่นของ LA (99% LA, Sigma-Aldrich,

USA) ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 280.45 กรัมต่อโมล) โดยใช้สารละลาย Tween 80 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์อิมัลชั่นที่เตรียมได้เก็บรักษาในภาชนะทึบแสงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2 น้ำมันถั่วเหลือง

น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) (น้ำมันถั่วเหลือง ตราองุ่น, บริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด (มหาชน), นครปฐม) จะใช้เป็นสับสเทรตในการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ทดแทนสับสเตรท LA เพื่อผลิต CLA จาก *L. plantarum* จะเตรียมในรูปอิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้สารละลาย Tween 80 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ นำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อิมัลชั่นที่เตรียมได้เก็บรักษาในภาชนะทึบแสงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

* อิมัลชั่นของ LA และน้ำมันถั่วเหลืองที่เตรียมและแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อต้องทำการละลายและนำไปกระจายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง sonication bath เป็นเวลา 5 นาที

3.3 การทดลองที่ I : การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกได้สูง

3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

การเตรียมกล้าเชื้อทำโดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่เก็บในอาหารเหลว MRS ที่มีสารละลายกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.4-0.5 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร นำกล้าเชื้อไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พร้อมทั้งกลับหลอดเป็นครั้งคราว

3.3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการผลิต CLA ได้สูง

การศึกษาในส่วนนี้ดำเนินการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* จำนวน 44 ไอโซเลต ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร โดยเริ่มจากถ่ายกล้าเชื้อจากอาหาร MRS ที่ปรับค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ 10 (OD_{600}~10) ปริมาตร 0.14 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MMRS ปริมาตร 14 มิลลิลิตร (ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.1) ที่มีการเติมสับสเตรท LA และไม่เติม เพื่อเปรียบเทียบและวิเคราะห์ความสามารถในการผลิต CLA ของเชื้อแต่ละไอโซเลต ซึ่งสามารถแบ่งการเพาะเลี้ยงออกเป็น 2 ส่วนดังนี้

(1) เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MMRS ที่เติม LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์

(2) เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MMRS

ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 ไอโซเลต เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 และ 36 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช และเก็บตัวอย่างสำหรับการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณ CLA ที่ผลิตได้ในแต่ละช่วงเวลา

3.3.3 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเติบโตและความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum*

การศึกษาส่วนนี้นำผลที่คำนวณจากโครมาโตแกรมมาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบผลการเติบโตและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MMRS ที่เติม LA และอาหารเหลว MMRS โดยแบ่งผลการวิเคราะห์ออกเป็น 7 ส่วนดังนี้

(1) การวิเคราะห์การเติบโตของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต

(2) การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต

(3) การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต

(4) การวิเคราะห์ผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต

(5) การวิเคราะห์ความเข้มข้นของ CLA ของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต

(6) การวิเคราะห์ผลได้ของ CLA จากเซลล์ของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต

(7) การวิเคราะห์ร้อยละของ CLA ที่เป็นองค์ประกอบในกรดไขมันทั้งหมดของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต

3.3.4 ชนิดของอาหารหมักที่เป็นแหล่งของ *L. plantarum* ต่อความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก

การศึกษาส่วนนี้เพื่อเปรียบเทียบและวิเคราะห์ความสามารถในการผลิต CLA จากการแบ่งกลุ่มแหล่งที่มาของเชื้อ *L. plantarum* ออกเป็นสองกลุ่มตามชนิดของอาหารหมัก คือ กลุ่มอาหารหมักจากเนื้อสัตว์และกลุ่มอาหารหมักจากผัก

3.3.5 อัตราการเปลี่ยนรูปกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก

การศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพ/ศักยภาพในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* แต่ละไอโซเลตจากอัตราการเปลี่ยนรูปกรด

ไขมันไลโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MMRS ที่เติม LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ จากสมการ (1) อัตราการเปลี่ยนรูปสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)

$$(1) \quad = \quad \frac{\text{ความเข้มข้นของ CLA (μg/mL)} \times 100}{\text{[ความเข้มข้นของ CLA (μg/mL) + ความเข้มข้นของ LA (μg/mL)]}}$$

3.4 การทดลองที่ II : การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิกต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจาก *L. plantarum* ที่คัดเลือก

การศึกษาในส่วนนี้ดำเนินการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 (ไอโซเลต NB05 และ NB289) ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเหลว MMRS ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสับสเตรท LA เท่ากับ 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ หรือความเข้มข้น LA เท่ากับ 140, 280, 560 และ 1,120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่เติมสับสเตรท LA (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช ปริมาณการผลิต CLA และอัตราการเปลี่ยนรูปของกรดไขมันไลโนเลอิกในแต่ละช่วงเวลา

3.5 การทดลองที่ III : การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจาก *L. plantarum* ที่คัดเลือกได้

การศึกษาในส่วนนี้ดำเนินการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 (ไอโซเลต NB05 และ NB289) ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MMRS ที่มีการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 (พีเอช 3.5-5.5 ใช้ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และพีเอช 6.5-7.5 ใช้โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์) พร้อมทั้งเติมสับสเตรท LA ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 และ 36 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช และวิเคราะห์ ปริมาณการผลิต CLA รวมทั้งอัตราการเปลี่ยนรูปของกรดไขมันไลโนเลอิกในแต่ละช่วงเวลา โดยมีชุดการทดลองควบคุม คือ การเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ (พีเอชเริ่มต้น 6.7)

3.6 การทดลองที่ IV : การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้อิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองเป็นสับสเตรทเพื่อผลิต CLA

การศึกษาในส่วนนี้ดำเนินการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 (ไอโซเลต NB05 และ NB289) ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว MMRS ที่มีการแปรผันความเข้มข้นอิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองเริ่มต้นเท่ากับ 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ โดยมีตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) คือ อาหารเลี้ยงเหลว MMRS ที่เติมสับสเตรท LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ และตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) คือ อาหารเหลว MMRS ที่ไม่มีการเติมสับสเตรท LA (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช พร้อมทั้งวิเคราะห์การเติบโต ปริมาณการผลิต CLA และอัตราการเปลี่ยนรูปของกรดไขมันไลโนเลอิกในแต่ละช่วงเวลา

3.7 การทดลองที่ V : การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

3.7.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่เก็บในอาหาร MRS ที่มีสารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเหลว MMRS ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 4 ฟลาสก์ นำไปไล่อากาศออกด้วยแก๊สไนโตรเจนและพันจุกสำลีด้วยพลาสติกห่ออาหารให้แน่นเพื่อไม่ให้อากาศเข้าสู่ฟลาสก์ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.7.2 การเตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

(1) ประกอบถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร รุ่น Biostat® B plus twin และต่ออิเล็กโทรดต่างๆ ที่ผ่านการเทียบค่าแล้วเข้ากับหน่วยควบคุม ได้แก่ พีเอช และอุณหภูมิ เป็นต้น จากนั้นเติมอาหารเหลว MMRS ปริมาตร 850 มิลลิลิตร ลงสู่ถังหมัก (MMRS ที่ละลายกลูโคสแยก) เติมน้ำเข้าสู่ส่วนของแจ็คเก็ตให้สูงกว่าปริมาตรของอาหาร ประกอบอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องให้เรียบร้อย ปิดสายเก็บตัวอย่างและส่วนที่จุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้แน่น แล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ

121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ

(2) เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อถังปฏิกรณ์ชีวภาพแล้ว รอให้อุณหภูมิของถังปฏิกรณ์ชีวภาพลดลง จากนั้นจึงเติมกลูโคสที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อแล้ว ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร) ทำการตั้งค่าสภาวะควบคุมต่างๆ คือ อัตราการกวน อุณหภูมิ และพีเอช จากนั้นทำการทดสอบระบบการทำงานทั้งหมดอีกครั้งก่อนเริ่มการเพาะเลี้ยง

3.7.3 กระบวนการหมักแบบแบทช์

การศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิต CLA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้เลือกใช้แบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 (ไอโซเลต NB289 NB05 NB311 และ N324) ทั้ง 4 ไอโซเลต มาดำเนินการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบแบทช์ ซึ่งเริ่มจากการเติมกล้าเชื้อปริมาตร 150 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ลงในถังที่มีอาหาร MMRS ปริมาตร 1.35 ลิตร ควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ไม่มีการให้อากาศ (Microaerobic cultivation) โดยแปรผันค่าพีเอชควบคุมในแต่ละชุดการทดลอง (ด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2 โมลาร์ และ H_3PO_4 ความเข้มข้น 2 โมลาร์) และช่วงเวลาในการเติมสับสเตรทดังนี้

(1) ควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 และเติมกรดไขมันไลโนเลอิกความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ (ไอโซเลต NB289, NB05, NB311 และ N324)

(2) ควบคุมค่าพีเอชที่ 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 และเติมกรดไขมันไลโนเลอิกความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมัก (ไอโซเลต NB289)

(3) ไม่ควบคุมค่าพีเอชและเติมกรดไขมันไลโนเลอิกความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ (ไอโซเลต NB289)

(4) ไม่ควบคุมค่าพีเอชและเติมกรดไขมันไลโนเลอิกความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมัก (ไอโซเลต NB289)

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงทำการเก็บตัวอย่างทุก 1.5 ชั่วโมง และเมื่อเซลล์เจริญเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ ยังคงดำเนินการเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 48 ชั่วโมง พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง (รวมระยะในการเพาะเลี้ยงทั้งหมดประมาณ 55-59 ชั่วโมง) เพื่อนำไปวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ ค่าพีเอช ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และปริมาณ CLA ที่ผลิตได้ในแต่ละช่วงเวลารวมถึงนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) และผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ ($Y_{p/x}$)

3.8 การวิเคราะห์

3.8.1 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์

การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดำเนินการใน 3 รูปแบบ คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความขุ่นของเซลล์ และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต โดยค่าน้ำหนักเซลล์แห้งหาได้จากการนำตัวอย่างเซลล์ที่ได้จากน้ำหมักมาทำการเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าความขุ่นของเซลล์หาได้โดยการนำน้ำหมักมาเจือจางในอัตราที่เหมาะสมก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตหาได้โดยใช้เทคนิค colony plate count

3.8.2 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชทำโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ที่ผ่านการปรับเทียบค่าโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานที่ค่าพีเอชเท่ากับ 4.01 และ 7.0

3.8.3 การสกัดลิปิด (Lipid extraction)

วิธีการสกัดลิปิดจากตัวอย่างน้ำหมักที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Liu และคณะ (2011) และ Coakley และคณะ (2003) ซึ่งทำโดยนำน้ำหมักปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดฝาเกลียว เติมกรดไขมันเพนตะเดคาโนอิก (pentadecanoic acid, C15:0) ปริมาณ 0.2012 มิลลิกรัม เพื่อใช้เป็นกรดไขมันมาตรฐานภายใน (internal fatty acid standard) และสกัดลิปิดโดยใช้ตัวทำละลายผสมที่มีไอโซโพรพานอล (isopropanal) 1 มิลลิลิตร (เขย่าผสมให้เข้ากันนาน 60 วินาที) และเฮกเซน (hexane) 3 มิลลิลิตร (เขย่าผสมอีก 30 วินาที) หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้นอย่างสมบูรณ์ ดูดของเหลวส่วนใสด้านบนใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียว และนำไปประเหยเฮกเซนภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

การสกัดตัวอย่างเซลล์ทำโดยเติมน้ำกลั่นลงในตะกอนเซลล์แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการสกัดเช่นเดียวกับการสกัดตัวอย่างส่วนใส

3.8.4 การเตรียมเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน

การเตรียมเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid methyl esters, FAMEs) ดำเนินการโดยนำลิปิดที่สกัดได้จากข้อ 3.8.3 มาใช้ในการเตรียมกรดไขมันอนุพันธุ์เมธิลเอสเทอร์ โดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรในเมทานอล) ปริมาตร 2

มิลลิลิตร นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมเฮกเซนที่มี butylated hydroxyltoluene (BHT, ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเขย่าผสมให้เข้ากันนาน 60 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นอย่างสมบูรณ์ ดูดส่วนใสด้านบนกรองผ่านโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ (anhydrous sodium sulphate; Na_2SO_4) เพื่อกำจัดความชื้นที่เหลือ แยกส่วนใสนำไปวิเคราะห์กรดไขมันด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography; GC) โดยใช้คอลัมน์ HP-INNOWax (polyethylene glycol (PEG) capillary) (Algilent , California, USA)

3.8.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี

นำสารละลายเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เตรียมได้จากข้อ 3.8.4 มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี โดยใช้ pentadecanoic acid ปริมาณ 0.2012 มิลลิกรัม เป็นกรดไขมันมาตรฐานภายใน และสภาวะในการวิเคราะห์เป็นดังนี้

- อุณหภูมิส่วนฉีดสาร (injector temperature) : 250 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิของคอลัมน์ (column temperature) :

  เริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที

  เพิ่มอุณหภูมิจนถึง 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียสนาน 7 นาที

  เพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิไว้ที่ 200 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที

  เพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 230 องศาเซลเซียสด้วยอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิไว้ที่ 230 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที
- อุณหภูมิของอุปกรณ์ตรวจวัด (detector temperature): 260 องศาเซลเซียส
- แก๊สพา (carrier gas) : ฮีเลียม อัตราการไหลของแก๊ซ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

3.8.6 การวิเคราะห์ผลปริมาณกรดไขมัน

นำผลข้อมูลโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์กรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโต-กราฟีมาวิเคราะห์ผลดังนี้

(1) วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (Total fatty acids; TFA)

- ในตัวอย่างส่วนใส (TFA in supernatant; TFAS)

TFAS = (total area of FAs/area of IS) x (weight of IS/volume of sample)

- ในเซลล์ (TFA in cell; TFAC)

TFAC = (total area of FAs/area of IS) x (weight of IS/weight of cell)

- ผลรวมในตัวอย่างส่วนใสและเซลล์ (TFA in mixture; TFAM)

TFAM = (SUM area of IFAs/SUM area of IS) x (weight of IS/weight of cell)

(2) วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิด (Individual fatty acids; IFA)

- ในตัวอย่างส่วนใส (IFA in supernatant; IFAS)

IFAS = (area of IFAs/area of IS) x (weight of IS/volume of sample)

- ในเซลล์ (TAF in cell; TAFC)

IFAC = (area of IFAs/area of IS) x (weight of IS/weight of cell)

- ผลรวมในตัวอย่างส่วนใสและเซลล์ (IFA in mixture; IFAM)

IFAM = (SUM area of IFAs/SUM area of IS) x (weight of IS/weight of cell)

(3) วิเคราะห์ร้อยละของการเปลี่ยน LA เป็น CLA (% conversion)

%conversion = [area of CLA/(area of CLA + area of LA)] x 100

หมายเหตุ: การวิเคราะห์ %conversion จะวิเคราะห์เฉพาะจากตัวอย่างส่วนใส และวิเคราะห์รวมทั้งสองส่วน

3.8.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ ANOVA และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 16 (SPSS Inc., Illinois, U.S.A) ที่ค่า p-value 0.05

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การทดลองที่ I: การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก

จากงานวิจัยก่อนหน้าของ โฆษิต (2555) ซึ่งได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* ที่สามารถผลิต CLA จากอาหารหมักของไทยโดยใช้อาหารเหลว MRS ได้พบปัญหาเกี่ยวกับการยืนยันความสามารถในการผลิต CLA เนื่องจากอาหาร MRS มีส่วนประกอบของเนื้อวัวสกัด (beef extract) และตรวจพบ CLA ในอาหาร MRS เริ่มต้นในปริมาณค่อนข้างสูง ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทำการแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยการดัดแปลงสูตรอาหาร MRS โดยไม่เติมเนื้อวัวสกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อใช้ในการประเมินความสามารถของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิต CLA โดยอาหาร MRS สูตรดัดแปลง (Modified MRS) หรือ MMRS นี้เมื่อนำไปตรวจหาสัดส่วนของกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบเทียบกับอาหาร MRS พบว่าการปรับสูตรอาหารช่วยลดปริมาณ CLA (9CLA-1 และ 10CLA) (คาดว่ามาจากเนื้อวัวสกัด) ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4-1) ทำให้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต CLA ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

การทดลองนี้ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่มีความสามารถในการผลิต CLA จาก *L. plantarum* จำนวน 44 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากอาหารหมักของไทยโดยการเลี้ยงในอาหาร MMRS และ MMRS ที่เติมสับสเตรท LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่ง LA จะทำหน้าที่เป็นสับสเตรทและเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิต CLA โดยเซลล์จะถูกกระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์ไลโนเลเอทไอโซเมอเรส (Linoleate isomerase; LAI) ที่เป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการไบโอไฮโดรจิเนชั่น (Biohydrogenetion; BH) หรือกระบวนการลดความเป็นพิษของสับสเตรท LA เพื่อลดความเป็นพิษของ LA จึงทำการเปลี่ยนโครงสร้างของ LA (C18:2 ; *c*9, *c*12$\Delta^{9,12}$) เป็น CLA (C18:2 ; *c*9, *t*11$\Delta^{9,11}$) ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่ได้จากกระบวนการ BH ที่ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดไขมันอิ่มตัวชนิดกรดไขมันสเตียริก (Stearic acid (SA); C18:0) (Polan และคณะ, 1964 Kepler และคณะ, 1966) เนื่องจากกรดไขมันอิ่มตัวมีความเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียน้อยกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว (Dawson และ Kemp, 1970)

ตารางที่ 4-1

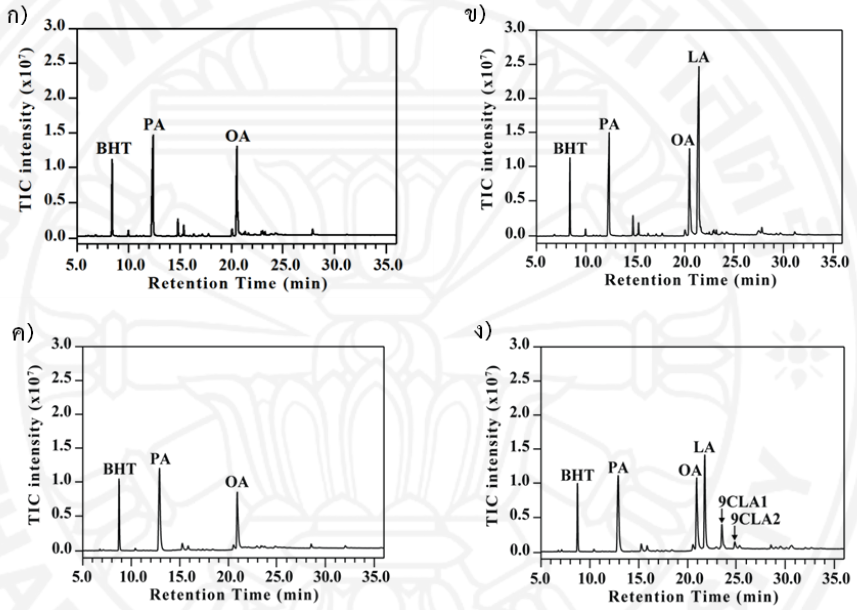
สัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิดกรดไขมัน (%)	ชนิดอาหาร		
	MMRS+LA	MMRS	MRS
ไมริสติก (C14:0)	0	0	0
ปาล์มิติก (C16:0)	3.9±0.4	6.7±0.3	6.6±1.2
ปาล์มิโตเลอิก (C16:1Δ^{9})	3.4±1.1	4.6±0.2	0
สเตียริก (C18:0)	1.6±0.2	2.5±0.2	4.5±0.6
โอเลอิก (C18:1Δ^{9})	31.7±0.4	69.6±0.8	68.4±0.9
ไลโนเลอิก (*c*9, *c*12$\Delta^{9,12}$)	49.0±1.2	1.2±0.2	3.0±0.9
9-CLA1 (*c*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	0.7±0.1	1.8±0.2	3.7±0.2
9-CLA2 (*t*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	0.1±0.0	0.4±0.0	0.5±0.0
10CLA (*t*10, *c*12$\Delta^{10,12}$)	0.8±0.2	1.5±0.0	4.8±1.1
CLA ทั้งหมด (total CLA)	1.6±0.2	3.7±0.1	9.0±0.5
กรดไขมันชนิดอื่นๆ	6.9±0.6	11.7±0.2	8.9±1.3

ในเบื้องต้นได้ทำการวิเคราะห์กรดไขมันจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิต CLA ด้วยอาหาร MMRS และ MMRS+LA โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตรกราฟีและระบุชนิดของ CLA โดยเทียบกับ retention time ของสาร CLA มาตรฐาน (9CLA-1, 9CLA-2 และ 10CLA) (Sigma-Aldrich Co., USA) พบว่ารูปแบบโครมาโตแกรมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลตเดียวกันด้วยอาหารทั้งสองแบบ มีความแตกต่างกัน (เฉพาะในไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิต CLA) โดยพบ chromatographic peak ของ CLA เฉพาะในเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร MMRS+LA (ภาพที่ 4-1) ซึ่ง chromatographic peak ที่ได้จาก *L. plantarum* จะประกอบด้วย 9CLA-1 เป็นไอโซเมอร์หลัก, 9CLA-2 เป็นไอโซเมอร์รอง และ 10CLA ไอโซเมอร์เพียงเล็กน้อย

<u>ภาพที่ 4-1</u>

โครมาโตแกรมแสดงชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำหมักส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB05 เมื่อเพาะเลี้ยงใน (ก) อาหาร MMRS ที่เวลา 0 ชั่วโมง (ข) อาหาร MMRS+LA ที่เวลา 0 ชั่วโมง (ค) อาหาร MMRS ที่เวลา 36 ชั่วโมง และ (ง) อาหาร MMRS+LA ที่เวลา 36 ชั่วโมง [BHT: butylhydroxytoluene, PA: pentadecanoic acid (internal standard), OA: oleic acid, LA: linoleic acid, 9CLA-1: *cis*-9,*trans*-11 CLA, 9CLA-2: *trans*-9,*trans*-11 CLA]



โดยเกณฑ์ในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการผลิต CLA นี้ได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MMRS+LA และใช้ผลการวิเคราะห์ร้อยละของ CLA ในกรดไขมันทั้งหมด (fatty acid composition in total fatty acid) ในน้ำหมักส่วนใสที่ไม่มีเซลล์ของ *L. plantarum*

โดยพิจารณาจากปริมาณการผลิต CLA ทั้งหมด (total CLA) และผลรวมของ CLA แต่ละไอโซเมอร์ในกรดไขมันทั้งหมด (total fatty acid) ที่เซลล์ผลิตได้ ผลพบว่าไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิต CLA ได้มากที่สุด มีสัดส่วนความเข้มข้นของ CLA มากกว่า 4-10 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด มีจำนวน 4 ไอโซเลต คือ *L. plantarum* NB05, NB289, NB311 และ NB324 เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 4 ไอโซเลตพบว่า *L. plantarum* NB05 ให้ผลผลิต total CLA สูงสุด (32.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมา คือ ไอโซเลต NB289 NB324 และ NB311 (32.7, 12.5 และ 12.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) สำหรับไอโซเลตที่ผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกได้ปริมาณน้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ ได้จำแนกให้อยู่ในกลุ่มที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 4-2 และ 4-3

CLA เป็นกรดไขมันที่ผลิตได้จากกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Shorland และคณะ, 1955) โดย 9CLA-1 ถูกค้นพบเป็นสารตัวกลางตัวแรกของกระบวนการ BH จาก LA โดย *B. fibrisolvens* ที่คัดแยกได้จากกระเพาะหมัก (Kepler และ Tove, 1967) จากการเป็นสับสเตรทของกระบวน BH การเติม LA ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นสิ่งจำเป็น/สำคัญต่อกระบวนการผลิต CLA อาหารที่ไม่มี LA ไม่สามารถใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต CLA ได้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jiang และคณะ (1998) ที่ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่ม Propionibacterium ในอาหารชนิดต่างๆ ที่ไม่เติมและเติม LA โดยมีการแปรผันความเข้มข้นของ LA พบว่าผลผลิต total CLA ในอาหารที่ไม่เติม LA มีปริมาณ CLA น้อยกว่าในอาหารที่เติม LA สอดคล้องกับการรายงานของ Lin และคณะ (1999) ที่กล่าวว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ไม่มีการเติม LA ทำให้ผลิต CLA ได้น้อยหรือไม่มีการผลิตเช่นกัน ดังนั้น การเติมสับสเตรท LA ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญมากในการผลิต CLA

ตารางที่ 4-2

สัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในน้ำหมักจากการเลี้ยง *L. plantarum* ไอโซเลตต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS

ชนิดกรดไขมัน	ร้อยละของกรดไขมันกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมด (% w/w)									
	NB10	NB108	NB273	NB23	NB302	NB33	NB34	NB423	NB394	NB189
กรดไมริสติก (C14:0)	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.4 ± 0.2	1.2 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.4 ± 0.0
กรดปาล์มิติก (C16:0)	6.0 ± 0.7	7.3 ± 2.0	7.0 ± 0.3	3.3 ± 4.7	6.1 ± 0.0	7.3 ± 0.0	5.7 ± 1.2	5.5 ± 0.0	4.8 ± 0.0	5.5 ± 0.0
กรดปาล์มิโตเลอิก (C16:1Δ^{9})	2.9 ± 0.3	2.9 ± 0.2	3.2 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.0 ± 0.0	2.6 ± 0.0	3.1 ± 0.7	2.7 ± 0.0	2.6 ± 0.0	3.3 ± 0.0
กรดสเตียริก (C18:0)	5.5 ± 0.8	5.9 ± 1.4	6.4 ± 0.5	4.9 ± 0.0	4.8 ± 0.0	3.4 ± 0.0	4.8 ± 1.1	5.4 ± 0.0	4.3 ± 0.0	4.0 ± 0.0
กรดโอเลอิก (C18:1Δ^{9})	58.9 ± 2.9	50.7 ± 1.2	64.1 ± 1.8	62.7 ± 1.1	62.1 ± 0.0	59.1 ± 0.0	56.6 ± 1.7	57.2 ± 0.0	56.3 ± 0.0	59.6 ± 0.0
ไลโนเลอิก (*c*9, *c*12$\Delta^{9,12}$)	0 .5 ± 0.0	0.4 ± 0.6	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1.4 ± 0.0	0.2 ± 0.3	5.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	0
9CLA-1 (*c*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	3.5 ± 0.7	1.1 ± 0.5	2.6 ± 0.0	1.8 ± 0.1	0.5 ± 0.0	2.4 ± 0.0	0.8 ± 1.2	1.1 ± 0.0	0.9 ± 0.0	1.4 ± 0.0
9CLA-2 (*t*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	2.1 ± 0.4	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.6 ± 0.0	1.6 ± 0.0	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.5 ± 0.0
10CLA (*t*10, *c*12$\Delta^{10,12}$)	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.0	1.8 ± 0.0	0	0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.9 ± 0.0
CLA ทั้งหมด (total CLA)	6.2 ± 1.4	3.0 ± 1.6	4.9 ± 0.5	3.9 ± 0.1	2.8 ± 0.0	4.0 ± 0.0	2.1 ± 0.9	3.1 ± 0.0	2.7 ± 0.0	3.8 ± 0.0
กรดไขมันชนิดอื่นๆ	18.6 ± 5.8	28.6 ± 4.9	12.5 ± 1.6	19.4 ± 3.6	19.3 ± 0.0	20.9 ± 0.0	26.0 ± 1.6	19.9 ± 0.0	26.1 ± 0.0	22.4 ± 0.0

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

สัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในน้ำหมักจากการเลี้ยง *L. plantarum* ไอโซเลตต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS

ชนิดกรดไขมัน	ร้อยละของกรดไขมันกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมด (% w/w)									
	NB192	NB200	NB409	NB05	NB22	NB426	NB121	NB13	NB14	NB142
ไมริสติก (C14:0)	1.2 ± 0.5	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.0	1.7 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.0	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.0	1.1 ± 0.0
ปาล์มิติก (C16:0)	7.3 ± 3.7	8.0 ± 0.6	6.1 ± 0.0	3.1 ± 4.3	6.0 ± 1.2	5.8 ± 0.0	6.2 ± 2.9	7.1 ± 0.6	6.3 ± 0.0	6.4 ± 0.0
ปาล์มิโตเลอิก (C16:1Δ^{9})	2.3 ± 0.7	3.3 ± 0.4	3.1 ± 0.0	3.2 ± 0.6	2.9 ± 0.5	2.8 ± 0.0	2.4 ± 0.7	2.1 ± 0.4	3.1 ± 0.0	2.1 ± 0.0
สเตียริก (C18:0)	5.9 ± 2.5	3.1 ± 0.3	5.6 ± 0.0	4.1 ± 2.2	5.7 ± 0.9	5.0 ± 0.0	5.8 ± 2.2	6.4 ± 0.6	5.3 ± 0.0	5.2 ± 0.0
โอเลอิก (C18:1Δ^{9})	50.4 ± 1.9	56.0 ± 5.6	58.7 ± 0.0	59.5 ± 7.0	57.2 ± 1.4	59.0 ± 0.0	48.7 ± 1.6	49.5 ± 8.1	64.2 ± 0.0	53.8 ± 0.0
ไลโนเลอิก (*c*9, *c*12$\Delta^{9,12}$)	1.2 ± 1.7	3.7 ± 3.0	4.8 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0	2.4 ± 0.0	0	6.7 ± 0.4	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.0
9CLA-1 (*c*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	2.6 ± 0.2	1.8 ± 0.4	1.9 ± 0.0	0.8 ± 1.2	1.3 ± 1.8	2.2 ± 0.0	2.1 ± 0.7	2.0 ± 0.5	1.0 ± 0.0	1.6 ± 0.0
9CLA-2 (*t*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.0	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.4 ± 0.5	0.6 ± 0.0	1.5 ± 0.0	1.2 ± 0.0
10CLA (*t*10, *c*12$\Delta^{10,12}$)	0	0.7 ± 0.1	0	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.0	0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0
CLA ทั้งหมด (total CLA)	4.0 ± 0.1	3.9 ± 0.6	3.2 ± 0.0	2.9 ± 0.7	3.6 ± 1.8	3.4 ± 0.0	3.9 ± 1.7	3.0 ± 0.0	3.1 ± 0.0	2.8 ± 0.0
กรดไขมันชนิดอื่นๆ	27.7 ± 1.8	20.4 ± 0.9	17.2 ± 0.0	25.3 ± 2.0	23.3 ± 1.0	20.3 ± 0.0	31.9 ± 2.5	24.0 ± 1.7	15.9 ± 0.0	28.1 ± 0.0

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

สัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในน้ำหมักจากการเลี้ยง *L. plantarum* ไอโซเลตต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS

ชนิดกรดไขมัน	ร้อยละของกรดไขมันกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมด (% w/w)									
	NB169	NB185	NB281	NB289	NB295	NB311	NB324	NB404	NB421	NB180
ไมริสติก (C14:0)	1.4 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.4 ± 0.4	1.5 ± 0.5	1.4 ± 0.0	1.4 ± 0.6	1.1 ± 0.2	1.5 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.2
ปาล์มิติก (C16:0)	5.9 ± 0.0	5.5 ± 0.0	6.9 ± 1.1	2.2 ± 3.1	7.2 ± 0.0	0	5.8 ± 2.5	6.7 ± 0.0	5.8± 0.0	3.2 ± 0.5
ปาล์มิโตเลอิก (C16:1Δ^{9})	2.6 ± 0.0	2.6 ± 0.0	2.5 ± 0.6	3.5 ± 0.9	3.6 ± 0.0	2.7 ± 0.9	2.4 ± 0.3	3.1 ± 0.0	2.8 ± 0.0	2.9 ± 0.7
กรดสเตียริก (C18:0)	2.2 ± 0.0	0	6.1 ± 1.6	4.5 ± 1.0	5.7 ± 0.0	4.6 ± 1.6	4.9 ± 1.7	5.7 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.8
กรดโอเลอิก (C18:1Δ^{9})	58.2 ± 0.0	59.2 ± 0.0	52.6 ± 1.5	56.5 ± 0.8	62.5 ± 0.0	52.6 ± 6.3	49.5 ± 1.5	62.5 ± 0.0	60.7 ± 0.0	54.2 ± 1.7
ไลโนเลอิก (*c*9, *c*12$\Delta^{9,12}$)	4.0 ± 0.0	5.1 ± 0.0	1.0 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.2 ±0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.2 ± 0.0
9CLA-1 (*c*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	1.1 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.9 ± 0.2	1.0 ± 0.4	0.7 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.4 ± 0.6	0.8 ± 0.0	1.3 ± 0.0	2.0 ± 0.3
9CLA-2 (*t*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	0.6 ± 0.0	1.6 ± 0.0	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.3	0.7 ± 0.0	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.4 ± 0.0	1.6 ± 0.0	1.2 ± 0.4
10CLA (*t*10, *c*12 $\Delta^{10,12}$)	0.8 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.3	1.2 ± 0.2	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0
CLA ทั้งหมด (total CLA)	2.4 ± 0.0	3.1 ± 0.0	3.7 ± 0.2	2.9 ± 1.1	2.3 ± 0.0	3.7 ± 0.4	3.6 ± 1.0	2.8 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.9 ± 0.7
กรดไขมันชนิดอื่นๆ	23.3 ± 0.0	23.3 ± 0.0	25.9 ± 0.2	28.3 ± 1.3	16.7 ± 0.0	34.6 ± 9.7	32.4 ± 2.0	17.2 ± 0.0	20.4 ± 0.0	29.4 ± 1.4

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

สัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในน้ำหมักจากการเลี้ยง *L. plantarum* ไอโซเลตต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS

ชนิดกรดไขมัน	ร้อยละของกรดไขมันกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมด (% w/w)									
	NB182	NB229	NB17	NB231	NB384	NB31	NB406	NB54	NB191	NB419
ไมริสติก (C14:0)	1.3 ± 0.0	1.4 ± 0.5	1.3 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.4 ± 0.3	1.4 ± 0.0	1.6 ± 0.5	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.0
ปาล์มิติก (C16:0)	6.3 ± 0.0	7.2 ± 2.7	5.8 ± 0.0	5.2 ± 0.0	7.0 ± 1.6	5.2 ± 0.0	6.9 ± 2.1	0	7.0 ± 1.6	5.8 ± 0.0
ปาล์มิโตเลอิก (C16:1Δ^{9})	3.3 ± 0.0	2.6 ± 0.7	3.2 ± 0.0	2.8 ± 0.0	2.7 ± 0.7	3.3 ± 0.0	2.8 ± 0.8	2.9 ± 0.5	2.5 ± 0.8	3.4 ± 0.0
สเตียริก (C18:0)	5.4 ± 0.0	6.6 ± 2.2	5.0 ± 0.0	4.4 ± 0.0	5.7 ± 0.9	4.8 ± 0.0	6.0 ± 1.6	4.9 ± 0.7	3.3 ± 0.4	5.0 ± 0.0
โอเลอิก (C18:1Δ^{9})	61.4 ± 0.0	50.7 ± 1.5	59.2 ± 0.0	56.6 ± 0.0	52.4 ± 1.4	65.3 ± 0.0	51.1 ± 3.6	53.8 ± 9.6	50.6 ± 1.5	58.7 ± 0.0
ไลโนเลอิก (*c*9, *c*12$\Delta^{9,12}$)	2.5 ± 0.0	0.6 ± 0.5	4.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.8 ± 0.2	0	0.7 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.9 ± 0.0
9CLA-1 (*c*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	0	2.6 ± 0.3	0	2.3 ± 0.0	2.3 ± 0.3	0.7 ± 0.0	2.4 ± 0.0	2.4 ± 0.1	2.0 ± 0.3	1.7 ± 0.0
9CLA-2 (*t*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	1.3 ± 0.0	1.5 ± 0.3	1.1 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.5 ± 0.2	1.0 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.0	1.4 ± 0.0
10CLA (*t*10, *c*12 $\Delta^{10,12}$)	0.7 ± 0.0	0.3 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.3 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.4	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.6	0.9 ± 0.0
CLA ทั้งหมด (total CLA)	1.9 ± 0.0	4.4 ± 0.9	2.1 ± 0.0	4.4 ± 0.0	4.0 ± 0.5	2.8 ± 0.0	4.8 ± 0.5	4.6 ± 0.4	3.7 ±1.0	4.1 ± 0.0
กรดไขมันชนิดอื่นๆ	17.9 ± 0.0	26.5 ± 1.1	19.0 ± 0.0	24.9 ± 0.0	25.8 ± 1.7	17.3 ± 0.0	26.2 ± 1.0	32.1 ± 1.5	31.5 ± 2.2	20.7 ± 0.0

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

สัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในน้ำหมักจากการเลี้ยง *L. plantarum* ไอโซเลตต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS

ชนิดกรดไขมัน	ร้อยละของกรดไขมันกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมด (% w/w)			
	NB93	NB425	NRIC1067	NB403
ไมริสติก (C14:0)	1.2 ± 0.0	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.0	1.4 ± 0.0
ปาล์มิติก (C16:0)	5.5 ± 0.0	3.8 ± 0.4	6.8 ± 0.0	3.4 ± 0.9
ปาล์มิโตเลอิก (C16:1Δ^{9})	2.9 ± 0.0	2.6 ± 0.4	3.3 ± 0.0	3.1 ± 0.1
สเตียริก (C18:0)	2.4 ± 0.0	5.2 ± 1.2	5.1 ± 0.0	5.4 ± 0.2
โอเลอิก (C18:1Δ^{9})	55.5 ± 0.0	56.3 ± 1.9	63.0 ± 0.0	62.8 ± 1.1
ไลโนเลอิก (C18:2$\Delta^{9,12}$)	8.7 ± 0.0	0.3 ± 0.0	1.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
9CLA-1 (*c*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	1.3 ± 0.0	2.4 ± 0.1	0.7 ± 0.0	2.1 ± 0.1
9CLA-2 (*t*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	1.2 ± 0.0	1.6 ± 0.1	0.8 ± 0.0	1.6 ± 0.1
10CLA (*t*10, *c*12 $\Delta^{10,12}$)	0.5 ± 0.0	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.0	0.2 ± 0.0
CLA ทั้งหมด (total CLA)	2.9 ± 0.0	4.9 ± 0.4	2.4 ± 0.0	3.9 ± 0.1
กรดไขมันชนิดอื่นๆ	20.9 ± 0.0	25.6 ± 2.1	16.7 ± 0.0	19.6 ± 1.9

ตารางที่ 4-3

สัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในน้ำหมักจากการเลี้ยง *L. plantarum* ไอโซเลตต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS ที่เติม LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ (MMRS+LA)

ชนิดกรดไขมัน	**ร้อยละของกรดไขมันกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมด (% w/w)**									
	NB10	**NB108**	**NB273**	**NB23**	**NB302**	**NB33**	**NB34**	**NB423**	**NB394**	**NB189**
ไมริสติก (C14:0)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.6	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
ปาล์มิติก (C16:0)	1.5 ± 2.2	3.7 ± 0.3	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.3 ± 0.1	1.6 ± 2.2	2.6 ± 0.4	2.6 ± 0.5	2.4 ± 0.1
ปาล์มิโตเลอิก (C16:1Δ^{9})	1.9 ± 0.1	2.1 ± 0.3	2.2 ± 0.2	2.2 ± 0.3	1.5 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.0	1.5 ± 0.3
สเตียริก (C18:0)	2.7 ± 0.1	3.3 ± 0.8	3.0 ± 0.3	2.6 ± 0.1	1.5 ± 0.9	2.4 ± 0.0	2.0 ± 0.6	2.5 ± 0.5	2.4 ± 0.3	1.9 ± 0.1
โอเลอิก (C18:1Δ^{9})	31.3 ± 0.4	29.4 ± 2.6	31.3 ± 1.0	33.3 ± 0.5	29.5 ± 1.4	21.7 ± 0.8	28.5 ± 1.0	24.2 ± 1.8	26.2 ± 0.5	24.0 ± 3.6
ไลโนเลอิก (C18:2$\Delta^{9,12}$)	48.5 ± 0.6	38.9 ± 3.7	48.5 ± 0.1	43.7 ± 2.4	44.1 ± 1.7	43.7 ± 0.7	46.7 ± 3.5	44.9 ± 3.6	46.5 ± 0.3	39.3 ± 4.3
9CLA-1 (*c*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.2 ± 0.0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.0	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.0
9CLA-2 (*t*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.0	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
10CLA (*t*10, *c*12 $\Delta^{10,12}$)	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2± 0.2	0.1 ± 0.1
CLA ทั้งหมด (total CLA)	2.6 ± 0.1	2.7 ± 0.4	2.4 ± 0.1	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.5 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.6 ± 0.6	1.4 ± 0.5	1.3 ± 0.0
กรดไขมันชนิดอื่นๆ	10.6 ± 3.2	19.2 ± 1.2	8.3 ± 1.0	12.5 ± 0.9	18.5 ± 2.5	26.9 ± 1.0	16.9 ± 0.9	22.4 ± 2.3	19.2 ± 0.4	29.2 ± 8.6

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

สัดส่สัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในน้ำหมักจากการเลี้ยง *L. plantarum* ไอโซเลตต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS ที่เติม LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ (MMRS+LA)

ชนิดกรดไขมัน	**ร้อยละของกรดไขมันกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมด (% w/w)**									
	NB192	**NB200**	**NB409**	**NB05**	**NB22**	**NB426**	**NB121**	**NB13**	**NB14**	**NB142**
ไมริสติก (C14:0)	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
ปาล์มิติก (C16:0)	3.4 ± 0.8	3.9 ± 0.5	2.7 ± 0.2	1.4 ± 1.9	1.3 ± 0.2	1.1 ± 0.5	2.7 ± 0.5	3.2 ± 0.1	3.2 ± 0.8	2.8 ± 0.2
ปาล์มิโตเลอิก (C16:1Δ^{9})	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.3	1.4 ± 0.0	1.8 ± 0.3	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.3	7.9 ± 0.8	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0.2
สเตียริก (C18:0)	2.9 ± 0.9	3.0 ± 0.3	2.8 ± 0.4	2.6 ± 0.0	2.7 ± 0.0	1.9 ± 0.2	2.8 ± 0.2	3.2 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.2 ± 0.1
โอเลอิก (C18:1Δ^{9})	29.0 ± 3.9	29.4 ± 3.0	27.3 ± 0.4	31.0 ± 1.5	26.0 ± 2.4	24.7 ± 4.2	26.3 ± 3.5	27.2 ± 0.6	26.4 ± 0.2	27.7 ± 4.1
ไลโนเลอิก (C18:2$\Delta^{9,12}$)	40.1 ± 3.4	42.3 ± 4.5	50.4 ± 0.8	33.5 ± 3.1	47.5 ± 3.9	43.3 ± 6.4	47.2 ± 5.0	45.1 ± 3.6	40.7 ± 1.7	44.0 ± 6.7
9CLA-1 (*c*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.4	8.7 ± 1.2	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.6	1.4 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.9 ± 0.3
9CLA-2 (*t*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.1
10CLA (*t*10, *c*12 $\Delta^{10,12}$)	0	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1	2.9 ± 0.4	0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0	0.6 ± 0.1	0
CLA ทั้งหมด (total CLA)	2.2 ± 0.3	1.7 ± 0.4	1.2 ± 0.9	**11.7 ± 1.3**	2.0 ± 0.1	1.6 ± 0.8	2.2 ± 0.0	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.5	1.3 ± 0.4
กรดไขมันชนิดอื่นๆ	20.0 ± 9.6	17.1 ± 9.3	13.7 ± 1.1	17.3 ± 4.4	18.4 ± 4.6	25.8 ± 0.4	10.4 ± 0.5	17.7 ± 4.1	23.6 ± 1.8	20.1 ± 1.7

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

สัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในน้ำหมักจากการเลี้ยง *L. plantarum* ไอโซเลตต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS ที่เติม LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ (MMRS+LA)

ชนิดกรดไขมัน	**ร้อยละของกรดไขมันกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมด (% w/w)**									
	NB169	**NB185**	**NB281**	**NB289**	**NB295**	**NB311**	**NB324**	**NB404**	**NB421**	**NB180**
ไมริสติก (C14:0)	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.8 ± 0.1
ปาล์มิติก (C16:0)	2.7 ± 0.0	2.3 ± 0.2	3.4 ± 0.7	2.4 ± 1.3	2.6 ± 0.1	2.9 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.5 ± 1.3	2.2 ± 0.1	3.4 ± 0.1
ปาล์มิโตเลอิก (C16:1Δ^{9})	1.6 ± 0.0	1.7 ± 0.1	1.9 ± 0.0	2.0 ± 0.2	1.7 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.9 ± 0.1
สเตียริก (C18:0)	2.1 ± 0.0	2.0 ± 0.1	2.7 ± 0.7	1.9 ± 0.9	1.9 ± 0.0	2.3 ± 0.0	2.8 ± 0.1	1.8 ± 0.6	2.1 ± 0.1	2.9 ± 0.0
โอเลอิก (C18:1Δ^{9})	26.4 ± 0.0	24.7 ± 0.5	27.9 ± 2.2	30.5 ± 2.0	26.6 ± 1.1	31.5 ± 1.5	30.5 ± 2.8	27.2 ± 0.2	25.9 ± 0.3	33.1 ± 3.4
ไลโนเลอิก (*c*9, *c*12$\Delta^{9,12}$)	39.0 ± 0.0	40.6 ± 2.3	42.5 ± 3.6	33.9 ± 3.0	38.9 ± 1.7	38.8 ± 3.9	40.3 ± 4.1	39.2 ± 0.6	46.1 ± 0.7	40.4 ± 4.5
9CLA-1 (*c*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	0.9 ± 0.0	1.3 ± 0.2	1.0 ± 0.1	7.4 ± 1.1	1.8 ± 0.0	2.6 ± 0.2	2.7 ± 0.3	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.0	1.6 ± 0.1
9CLA-2 (*t*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0	1.0 ± 0.2	0.6 ± 0.0	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.3
10CLA (*t*10, *c*12 $\Delta^{10,12}$)	0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	3.0 ± 0.2	0.6± 0.3	0.9 ± 0.0	1.0 ± 0.1	0.3 ± 0.4	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.0
CLA ทั้งหมด (total CLA)	1.3 ± 0.0	1.8 ± 0.9	1.9 ± 0.0	**11.4 ± 1.5**	3.0 ± 0.3	**4.3 ± 0.3**	**4.5 ± 0.5**	1.4 ± 0.3	1.4 ± 0.1	2.9 ± 0.1
กรดไขมันชนิดอื่นๆ	26.5 ± 0.0	26.4 ± 3.9	18.9 ± 1.3	17.1 ± 1.1	24.8 ± 3.0	17.4 ± 1.0	17.8 ± 1.9	26.8 ± 1.7	20.4 ± 0.9	14.6 ± 8.4

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

สัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในน้ำหมักจากการเลี้ยง *L. plantarum* ไอโซเลตต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS ที่เติม LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ (MMRS+LA)

ชนิดกรดไขมัน	ร้อยละของกรดไขมันกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมด (% w/w)									
	NB182	NB229	NB17	NB231	NB384	NB31	NB406	NB54	NB191	NB419
ไมริสติก (C14:0)	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1
ปาล์มิติก (C16:0)	2.7 ± 0.3	3.4 ± 0.3	2.5 ± 0.2	2.7 ± 0.1	3.6 ± 1.5	1.1 ± 1.5	3.4 ± 0.0	2.8 ± 0.4	3.5 ± 0.6	2.5 ± 0.1
ปาล์มิโตเลอิก (C16:1Δ^{9})	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.4	1.4 ± 0.0	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.4	1.3 ± 0.0
สเตียริก (C18:0)	1.9 ± 0.5	3.3 ± 0.5	2.2 ± 0.3	2.3 ± 0.1	3.3 ± 1.0	2.0 ± 0.1	1.6 ± 2.2	1.9 ± 0.8	3.1 ± 0.4	2.2 ± 0.1
โอเลอิก (C18:1Δ^{9})	30.2 ± 1.3	29.6 ± 4.0	26.5 ± 0.4	28.5 ± 0.1	27.4 ± 5.4	26.4 ± 0.1	27.3± 3.0	31.0 ± 3.5	27.7 ± 2.4	23.7 ± 0.3
ไลโนเลอิก (*c*9, *c*12$\Delta^{9,12}$)	45.7 ± 1.4	43.1 ± 6.2	40.3 ± 2.1	44.4 ± 1.0	40.3 ± 3.2	39.7 ± 1.1	42.8 ± 4.8	42.1 ± 2.9	43.0 ± 4.7	52.5 ± 1.6
9CLA-1 (*c*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1
9CLA-2 (*t*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.0
10CLA (*t*10, *c*12 $\Delta^{10,12}$)	0.1 ± 0.2	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.3 ± 0.0	0.2± 0.1	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0
CLA ทั้งหมด (total CLA)	2.1 ± 0.1	2.3 ± 0.2	1.9 ± 0.1	1.4 ± 0.0	2.2 ± 0.3	1.6 ± 0.2	2.4 ± 0.0	2.6 ± 0.1	2.4 ± 0.2	1.6 ± 0.1
กรดไขมันชนิดอื่นๆ	15.3 ± 2.7	16.2 ± 9.8	24.6 ± 2.5	18.5 ± 0.8	20.8 ± 1.4	27.4 ± 2.7	20.2 ± 0.8	17.2 ± 1.5	17.8 ± 0.8	15.8 ± 1.6

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

สัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในน้ำหมักจากการเลี้ยง *L. plantarum* ไอโซเลตต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS ที่เติม LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ (MMRS+LA)

ชนิดกรดไขมัน	**ร้อยละของกรดไขมันกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมด (% w/w)**			
	NB93	**NB425**	**NRIC1067**	**NB403**
ไมริสติก (C14:0)	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.1
ปาล์มิติก (C16:0)	2.1 ± 0.1	2.8 ± 0.3	3.0 ± 0.4	1.5 ± 2.1
ปาล์มิโตเลอิก (C16:1Δ^{9})	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.0
สเตียริก (C18:0)	1.0 ± 1.4	2.8 ± 0.4	2.0 ± 0.3	2.7 ± 0.2
โอเลอิก (C18:1Δ^{9})	23.7 ± 0.8	27.0 ± 2.0	25.1 ± 1.2	30.4 ± 0.3
ไลโนเลอิก (*c*9, *c*12$\Delta^{9,12}$)	41.5 ± 0.1	46.9 ± 4.1	40.6 ± 0.6	47.6 ± 0.1
9CLA-1 (*c*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	0.8 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.0
9CLA-2 (*t*9, *t*11$\Delta^{9,11}$)	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1
10CLA (*t*10, *c*12$\Delta^{10,12}$)	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.3
CLA ทั้งหมด (total CLA)	1.5 ± 0.5	2.0 ± 0.1	1.5 ± 0.0	2.2 ± 0.1
กรดไขมันชนิดอื่นๆ	28.3 ± 2.9	16.5 ± 1.1	25.5 ± 2.8	13.1 ± 1.4

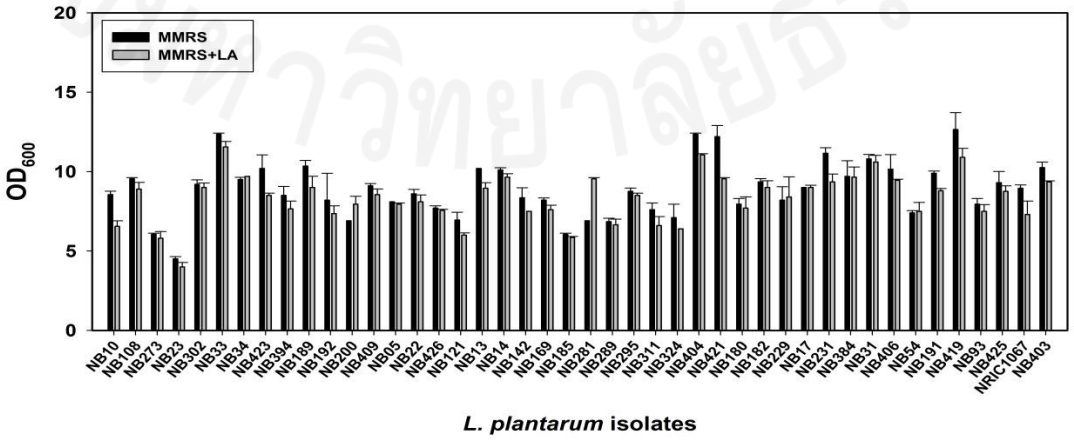
4.1.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเติบโตและความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum*

4.1.1.1 การวิเคราะห์การเติบโตของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต

การเพาะเลี้ยง *L. plantarum* แต่ละไอโซเลตในอาหาร MMRS และ MMRS ที่เติมสับสเตรท LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ (MMRS+LA) ให้ผลค่าความขุ่นของเซลล์ไม่แตกต่างกันโดย *L. plantarum* ส่วนใหญ่สามารถเติบโตในอาหาร MMRS ได้ดีกว่าอาหาร MMRS+LA ทั้งนี้มีการอธิบายในงานวิจัยก่อนหน้าว่าเป็นผลเนื่องจากสับสเตรท LA ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวที่มีคุณสมบัติเป็นสารยั้บยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) ที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยจะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตจำพวกโพรคาริโอตบางไอโซเลต (Maczulak และคณะ, 1981; Boyaval และคณะ, 1995; Jiang และคณะ, 1998) โดยแบคทีเรียแกรมบวกสามารถตอบสนองต่อการยับยั้งจากกรดไขมันได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Henderson และคณะ, 1973) จากเหตุผลข้างต้นส่งผลให้แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS+LA เจริญเติบโตช้าลงเนื่องจากความเป็นพิษของสับสเตรท LA ทำให้ค่าความขุ่นของเซลล์น้อยกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS เมื่อเปรียบเทียบการเติบโตของไอโซเลตต่างๆ ผลจากการศึกษาพบว่า *L. plantarum* NB419 ให้ค่าความขุ่นของเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (4.3 กรัมต่อลิตร ในอาหาร MMRS และ 3.5 กรัมต่อลิตร ในอาหาร MMRS+LA) และ *L. plantarum* NRIC1067 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่ำสุด (1.9 กรัมต่อลิตรในอาหาร MMRS และ 1.5 กรัมต่อลิตรในอาหาร MMRS+LA) (ภาพที่ 4-2 และ 4-3)

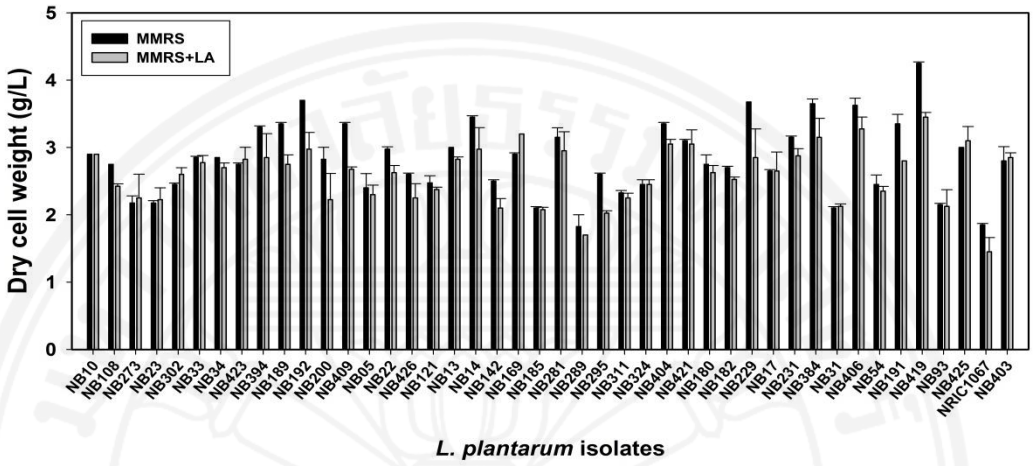
<u>ภาพที่ 4-2</u>

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS (แท่งสีดำ) และอาหาร MMRS ที่เติมสับสเตรท LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ (MMRS+LA) (แท่งสีเทา) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-3

น้ำหนักเซลล์แห้งของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS (แท่งสีดำ) และอาหาร MMRS+LA (แท่งสีเทา) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

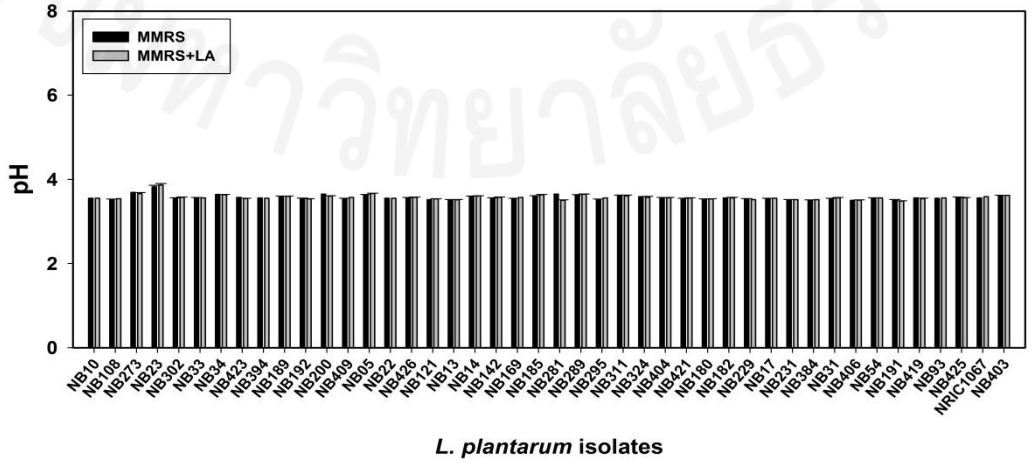


4.1.1.2 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักในการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* แต่ละไอโซเลตสามารถใช้ติดตามแนวโน้มการเจริญเติบโตหรือการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและการผลิต CLA เพื่อติดตามแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชแสดงดังภาพที่ 4-4

ภาพที่ 4-4

ค่าพีเอชของน้ำหมักของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS (แท่งสีดำ) และอาหาร MMRS+LA (แท่งสีเทา) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



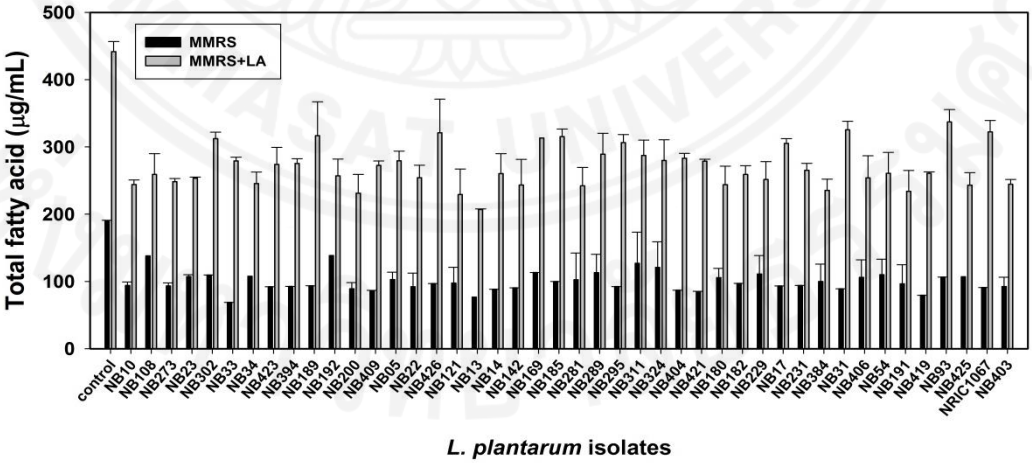
ทั้งนี้ ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารอยู่ในช่วงพีเอช 6.5-6.7 (ไม่แสดงข้อมูล) และหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่า ค่าพีเอชของอาหาร MMRS และ MMRS+LA มีค่าลดลงอยู่ในช่วงพีเอช 3.5-3.6 ซึ่งน่าจะมีผลจากการผลิตกรดอินทรีย์ของเชื้อในกลุ่มนี้โดยเฉพาะกรดแลคติกจากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การเติมสับสเตรท LA ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียน่าจะสามารถสร้างกรดแลคติกในอาหารทั้งสองชนิดได้ไม่แตกต่างกันมากนัก

4.1.1.3 ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต

การวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (total fatty acid) ระหว่าง *L. plantarum* ในแต่ละไอโซเลต แสดงดังภาพที่ 4-5 พบว่า ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดในน้ำหมักของการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดให้ผลแตกต่างกัน โดย *L. plantarum* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS+LA พบปริมาณกรดไขมันทั้งหมดได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ในทุกไอโซเลต ซึ่งเป็นผลจากการเติมกรดไขมันไลโนเลอิกที่เติมลง

<u>ภาพที่ 4-5</u>

ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดจากน้ำหมักของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS (แท่งสีดำ) และอาหาร MMRS+LA (แท่งสีเทา) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



หมายเหตุ : control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า ไอโซเลต *L. plantarum* NB93 ให้ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดสูงสุด (106.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหาร MMRS และ 337.1 ไมโครกรัมต่อ

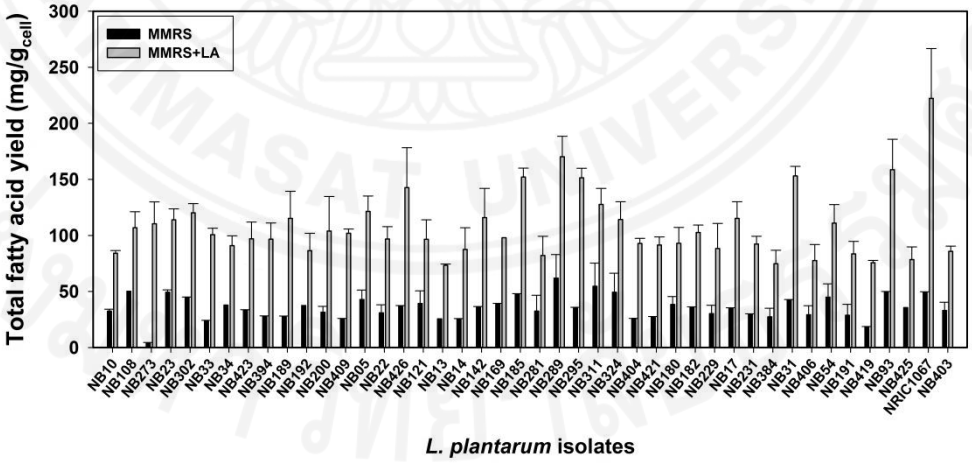
มิลลิลิตรในอาหาร MMRS+LA) และไอโซเลตที่ให้ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดต่ำสุดคือไอโซเลต *L. plantarum* NB13 (76.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหาร MMRS และ 206.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหาร MMRS+LA)

4.1.1.4 ผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต

การศึกษาผลได้ของกรดไขมันทั้งหมด (total fatty acid yield) ในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$ จากภาพที่ 4-6 พบว่าผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดให้ผลแตกต่างกัน โดย *L. plantarum* ทุกไอโซเลตให้ผลการผลิตกรดไขมันทั้งหมดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS น้อยกว่า MMRS+LA โดย *L. plantarum* NRIC1067 มีผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดมีค่าสูงสุด (49.2 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$ ในอาหาร MMRS และ 222.2 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$ ในอาหาร MMRS+LA) และไอโซเลตที่ให้ผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดต่ำสุด คือ ไอโซเลต NB13 (25.6 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$ ในอาหาร MMRS และ 73.3 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$ ในอาหาร MMRS+LA)

<u>ภาพที่ 4-6</u>

ผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดจากน้ำหมักของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต
ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS (แท่งสีดำ) และอาหาร MMRS+LA (แท่งสีเทา)
ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



ทั้งนี้ เนื่องจากผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดคำนวณจากปริมาณกรดไขมันทั้งหมดหารด้วยน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์แห้งจึงมีผลต่อปริมาณผลได้ของกรดไขมันทั้งหมด จากภาพที่ 4-2 จะเห็นได้ว่าไอโซเลต NRIC1067 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งน้อยที่สุด แต่มีปริมาณกรดไขมันทั้งหมดสูง จึงทำให้ผลได้กรดไขมันทั้งหมดมีค่าสูง ดังนั้น *L. plantarum* NRIC1067 จึงมีประสิทธิภาพในการ

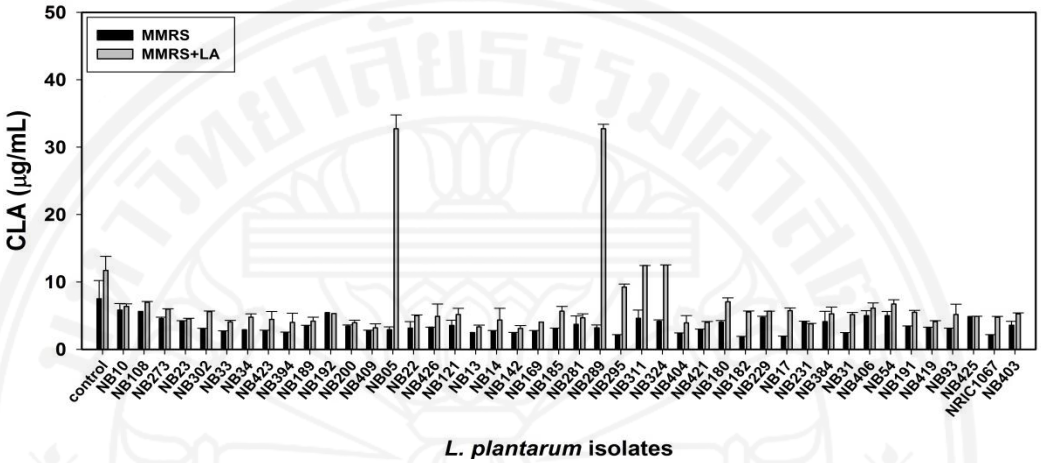
ผลิตกรดไขมันทั้งหมดต่อกรัม$_{เซลล์}$ ได้ดีที่สุด ดังนั้นความสามารถในการผลิตกรดไขมันขึ้นกับไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรีย

4.1.1.5 ความเข้มข้นของ CLA ของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต

การศึกษาความเข้มข้นของ CLA ในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเปรียบเทียบการผลิต CLA ระหว่างอาหารที่ใช้เลี้ยง *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต จากภาพที่ 4-7 พบการผลิต CLA ในอาหาร MMRS และ MMRS+LA ที่แตกต่างกันในบางไอโซเลต โดยไอโซเลตที่มีปริมาณการผลิต CLA แตกต่างระหว่างการเลี้ยงในอาหาร MMRS และ MMRS+LA คือ ไอโซเลต *L. plantarum* NB05 (32.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหาร MMRS+LA), NB289 (32.7±0.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหาร MMRS+LA), NB295 (9.2±0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหาร MMRS+LA), NB311 (12.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหาร MMRS+LA) และ NB324 (12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหาร MMRS+LA) จากข้อ 4.1.1.3 ปริมาณกรดไขมันที่ผลิตได้ใน *L. plantarum* แต่ละไอโซเลตไม่มีความสัมพันธ์ต่อการผลิต CLA อย่างเด่นชัด เมื่อวิเคราะห์เฉพาะการผลิต CLA พบว่า *L. plantarum* ทุกไอโซเลตไม่สามารถผลิต CLA เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS โดยจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติมสับสเตรท LA จะพบปริมาณ CLA ไม่แตกต่างมากนักหรือเพิ่มขึ้นจากที่พบในอาหารเพียงเล็กน้อย (CLA ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS และ MMRS+LA มีประมาณความเข้มข้น 7.5 และ 11.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามพบว่าบางไอโซเลตสามารถผลิต CLA ได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสับสเตรท LA แต่บางไอโซเลตไม่สร้าง CLA ถึงแม้ว่าจะเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท LA ก็ตาม อาจเกิดจากไอโซเลตนั้นๆ มีความสามารถในการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA ต่ำ นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากสภาวะที่ทำการทดลองไม่เหมาะสมต่อการผลิต CLA ของแต่ละไอโซเลต เช่น 1) ปริมาณสับสเตรท LA ที่เติม (1.0 มิลลิโมลาร์ หรือ 280.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ความเข้มข้นที่ใช้อาจสูงเกินไปหรือต่ำเกินไปสำหรับบางไอโซเลตจึงไม่พบหรือพบการผลิต CLA ได้น้อย 2) ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (36 ชั่วโมง) ระยะเวลาอาจไม่เหมาะสมต่อบางไอโซเลต 3) อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (35 $^{\circ}$ซ) สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* เป็นแบคทีเรียที่สามารถเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง 19-45 $^{\circ}$ซ อุณหภูมิจึงอาจส่งผลต่อการเติบโตเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ที่จะมีผลต่อการผลิต CLA ต่อไปได้ ดังนั้นสภาวะต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองจึงเป็นอีกเหตุผลที่มีผลต่อการผลิต CLA ที่แตกต่างกันได้ (Kishino และคณะ, 2002; Liu และคณะ, 2011; Li และคณะ, 2013)

ภาพที่ 4-7

ความเข้มข้นของ CLA ทั้งหมดในน้ำหมักของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS (แท่งสีดำ) และอาหาร MMRS+LA (แท่งสีเทา) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



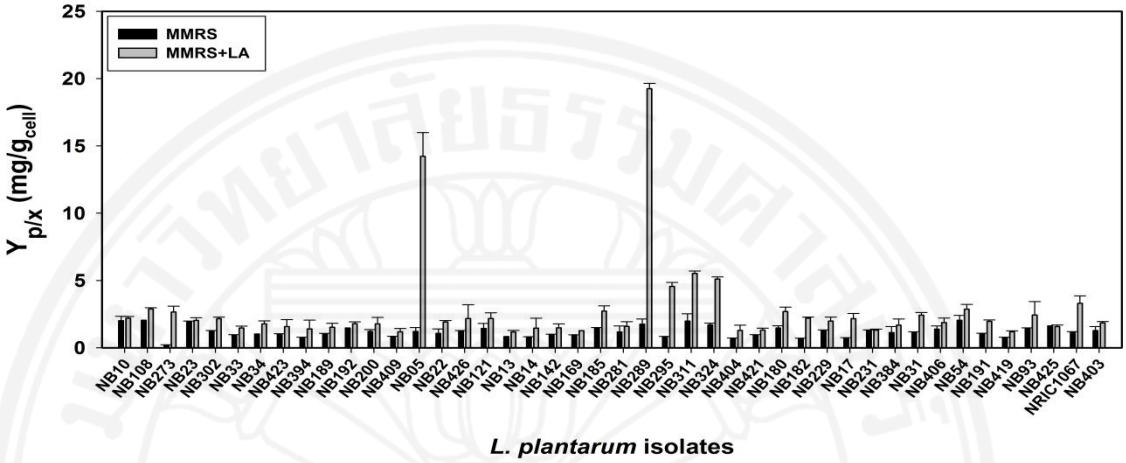
หมายเหตุ : control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1.1.6 ผลได้ของ CLA จากเซลล์ของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต

การศึกษาเปรียบเทียบผลได้ของ CLA จากเซลล์ในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$ ของ *L. plantarum*แต่ละไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS และอาหาร MMRS+LA จากภาพที่ 4-8 ผลได้ของ CLA จากเซลล์สอดคล้องกับปริมาณการผลิต CLA (4.1.1.5) ที่พบว่า *L. plantarum* 5 ไอโซเลต มีการผลิต CLA ที่แตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสับสเตรท LA (*L. plantarum* NB05, NB289, NB295, NB311 และ NB324) โดย *L. plantarum* NB289 ให้ผลได้ของ CLA จากเซลล์สูงที่สุด (19.2 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$) รองลงมาคือ *L. plantarum* NB05, NB311, NB324 และ *L. plantarum* NB295 ตามลำดับ (14.2, 5.5, 5.1 และ 4.6มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$) ทั้งนี้ จะเห็นได้ว่าผลได้ของ CLA จากเซลล์ ของไอโซเลต NB289 มีค่ามากกว่าไอโซเลต NB05 แม้ว่าปริมาณการผลิต CLA ของทั้ง 2 ไอโซเลตมีค่าไม่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่าไอโซเลต NB289 มีประสิทธิภาพในการผลิต CLA ได้ดีกว่า

ภาพที่ 4-8

ผลได้ของ CLA จากเซลล์ของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS (แท่งสีดำ) และอาหาร MMRS+LA (แท่งสีเทา) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

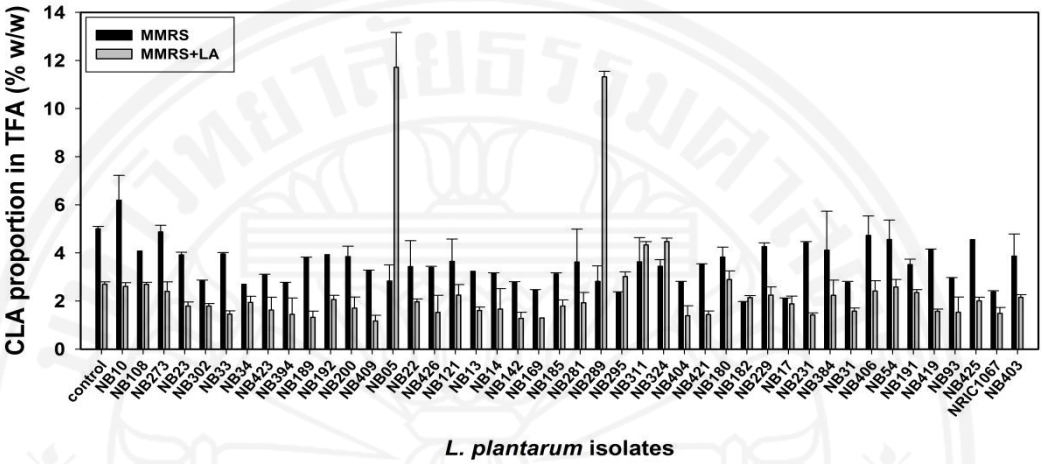


4.1.1.7 ร้อยละของ CLA ที่เป็นองค์ประกอบในกรดไขมันทั้งหมดของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต

การศึกษาเปรียบเทียบร้อยละของ CLA ในกรดไขมันทั้งหมดของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS และอาหาร MMRS+LA จากภาพที่ 4-9 พบว่าร้อยละของ CLA ในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในน้ำหมักของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร 2 ชนิดมีค่าแตกต่างกัน โดยการเลี้ยงในอาหาร MMRS พบปริมาณ CLA มากกว่าในอาหาร MMRS+LA ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1.9 ถึง 6.2 เปอร์เซ็นต์ในกรดไขมันทั้งหมด ในขณะที่ร้อยละของ CLA ในอาหาร MMRS+LA ส่วนใหญ่จะมีค่าในช่วง 1.2 ถึง 4.5 เปอร์เซ็นต์ในกรดไขมันทั้งหมด ยกเว้น NB05 และ NB289 ที่มีค่า CLA สูงสุดเท่ากับ 11.7 และ 11.3 เปอร์เซ็นต์ในกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ การพบปริมาณร้อยละของ CLA ในกรดไขมันทั้งหมดในแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS มากกว่าอาหาร MMRS+LA นั้นน่าจะเนื่องมาจากการเติม LA ทำให้ร้อยละของ LA ในกรดไขมันทั้งหมดมีค่าสูง เมื่อเทียบกับกรดไขมันชนิดอื่นๆ ส่งผลให้ค่าร้อยละ CLA ของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร MMRS+LA นั้นมีค่าน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม LA อย่างไรก็ตามพบว่าไอโซเลต NB05 และ NB289 มีค่าร้อยละของ CLA ที่สูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าเซลล์สามารถผลิต CLA ได้มาก จึงเป็นไอโซเลตที่น่าจะมีศักยภาพในการผลิต CLA

ภาพที่ 4-9

ร้อยละของ CLA ในกรดไขมันทั้งหมดของน้ำหมักของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS (แท่งสีดำ) และอาหาร MMRS+LA (แท่งสีเทา) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



หมายเหตุ : control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ

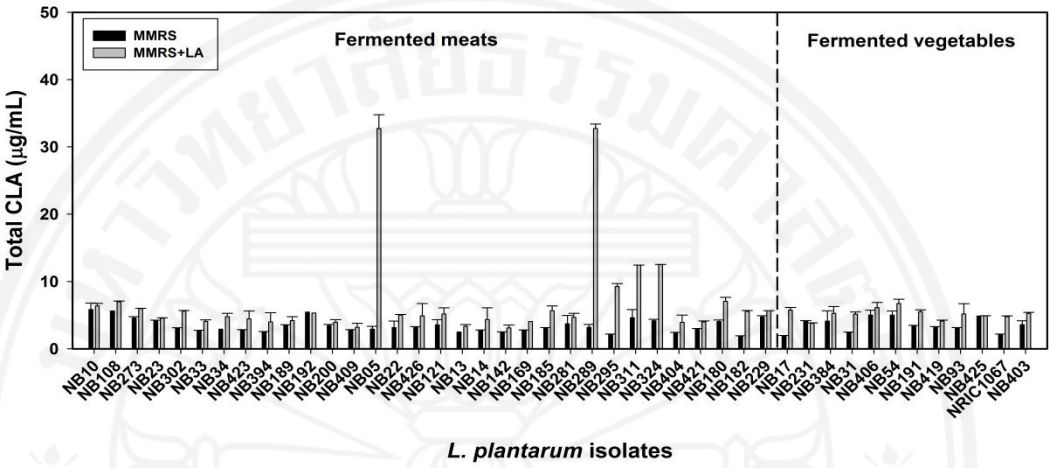
จากการศึกษาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงและผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิต CLA พบว่า *L. plantarum* บางไอโซเลตสามารถผลิต CLA ได้เฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสับสเตรท LA เท่านั้น (ภาพที่ 4-7) ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่มีความสามารถในการผลิต CLA คืออาหาร MMRS ที่มีการเติมสับสเตรท LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ โดยการผลิต CLA นอกจากจะขึ้นอยู่กับความสามารถของไอโซเลตแบคทีเรียแล้วปริมาณสับสเตรท LA ก็น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญต่อผลผลิต CLA

4.1.2 ชนิดของอาหารหมักที่เป็นแหล่งของ *L. plantarum* ต่อความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก

แบคทีเรียกรดแลคติก *L.plantarum* ที่ใช้ในการคัดเลือกทั้ง 44 ไอโซเลต ได้มาจากคัดแยกเชื้อจากอาหารหมักของไทย ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มตามแหล่งที่มาของเชื้อ กลุ่มที่ 1 คือ อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์ (fermented meat) ได้แก่ หม่ำหมู หม่ำเนื้อ ไส้กรอกอีสานหมู ไส้กรอกอีสานเนื้อ แหนมหมู กะปิ และกุ้งจ่อม และกลุ่มที่ 2 อาหารหมักประเภทผัก (fermented vegetable) ได้แก่ ผักเสี้ยนดอง หัวหอมดอง กะหล่ำปลีดอง และผักกาดดอง

<u>ภาพที่ 4-10</u>

ปริมาณกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมดในน้ำหมักส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* ไอโซเลตต่างๆ ในอาหาร MMRS (แท่งสีดำ) และอาหาร MMRS+LA (แท่งสีเทา) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

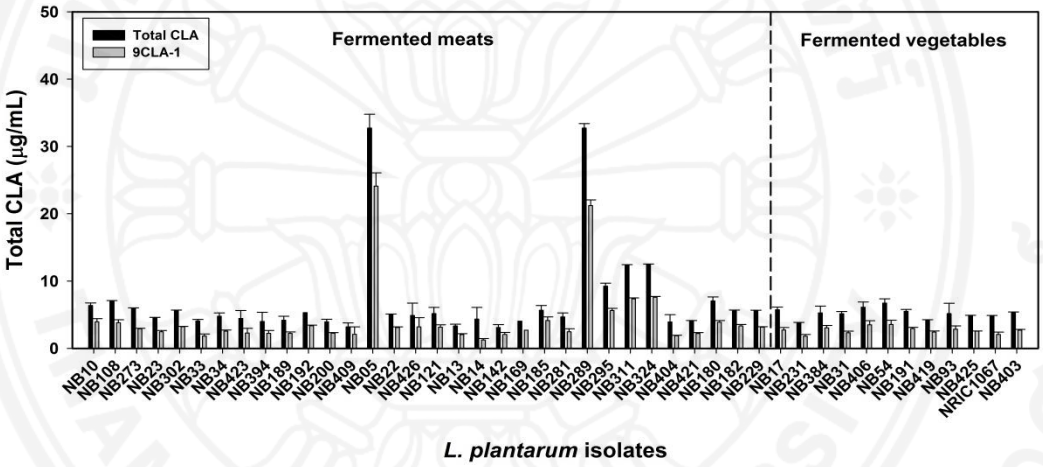


จากภาพที่ 4-10 แสดงปริมาณของ CLA ทั้งหมดของ *L. plantarum* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้คัดเลือกทั้งสองชนิด ซึ่งแบ่งออกเป็นสองกลุ่มตามแหล่งที่มาของเชื้อโดย กลุ่มแรก (ซ้ายมือ, ก่อนเส้นประ) คือ กลุ่มเชื้อที่แยกได้จากอาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์จำนวน 32 ไอโซเลต และกลุ่มที่สอง (ขวามือ, หลังเส้นประ) กลุ่มอาหารหมักประเภทผัก จำนวน 12 ไอโซเลต จากการใช้เกณฑ์คัดเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิต CLA โดยพิจารณาจากสัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามี 4 ไอโซเลตที่มีศักยภาพคือไอโซเลต NB05, NB289, NB311 และ NB324 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จาก อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์ (ภาพที่ 4-10 แท่งสีเทา) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dunford, 2001 ที่กล่าวว่าความเข้มข้นของ CLA ที่พบขึ้นอยู่กับแหล่งของอาหาร โดยพบว่าแหล่งอาหารประเภทเนื้อสัตว์ สามารถตรวจพบความเข้มข้นของ CLA มากกว่าอาหารประเภทพืช แสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการผลิต CLA และแหล่งที่ใช้ในการแยกเชื้อ *L. plantarum* (ภาคผนวก ง-6) และจากงานวิจัยของ Liu และคณะ (2011) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่คัดแยกจากผักดองชนิดต่างๆ ของประเทศจีนสามารถผลิต CLA ได้ (26.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ที่เติม LA ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม แม้ว่าวิธีการทดลองในงานวิจัยนี้มีลักษณะที่คล้ายกับงานวิจัยข้างต้น แต่ความเข้มข้นเริ่มต้นของ LA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ 1.0 มิลลิโมลาร์ หรือเท่ากับ 280.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นที่มากกว่าประมาณ 2.8 เท่า โดยอาจเป็นความเข้มข้นที่มากเกินไปส่งผลให้เกิดการยับยั้งการผลิต CLA นอกจากนี้ ระยะเวลา

ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่สั้นกว่า (36 ชั่วโมง) อาจส่งผลต่อผลผลิต CLA ให้น้อยกว่า ดังนั้น การศึกษาปริมาณ LA ที่เหมาะสมในการเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงอาจทำให้ส่งเสริมการผลิต CLA จากแบคทีเรียในกลุ่มอาหารหมักจากผัก

ภาพที่ 4-11

ปริมาณกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมดในน้ำหมักส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* ในอาหาร MMRS ที่เติม LA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (MMRS+LA) เป็นเวลา 36 ชั่วโมงกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมด (แท่งสีดำ) และไอโซเมอร์ 9CLA-1 (แท่งสีเทา) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ CLA ทั้งหมดที่ผลิตได้ของ *L. plantarum* พบว่าแต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้จากอาหารหมักของไทย สามารถผลิตไอโซเมอร์ 9CLA-1 ได้เป็นไอโซเมอร์หลัก โดยปริมาณ 9CLA-1 ที่ผลิตได้อยู่ในช่วง 59.2-73.7 เปอร์เซ็นต์ของ CLA ทั้งหมด รองลงมาคือไอโซเมอร์ 9CLA-2 (21.1 ถึง 26.0 เปอร์เซ็นต์ของ CLA ทั้งหมด) และ 10CLA (1.5-19.6 เปอร์เซ็นต์ของ CLA ทั้งหมด) ตามลำดับ (ภาคผนวก ง-7) แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการผลิตไอโซเมอร์ของ CLA ที่แตกต่างกันใน *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต โดยมีงานวิจัยที่กล่าวถึงปัจจัยของไอโซเลตจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีผลต่อความสามารถในการผลิตไอโซเมอร์ของ CLA ได้แตกต่างกัน ซึ่งมีความจำเพาะต่อการผลิตไอโซเมอร์แต่ละชนิด เช่น แบคทีเรียกรดแลคติกบางไอโซเลตสามารถผลิต 10CLA ได้มากกว่า 9CLA-1 (Kim และคณะ, 2002) *L. plantarum* ZS2058 และ *B. fibrisolvens* เป็นแบคทีเรียที่ผลิต 9CLA-1 เป็นไอโซเมอร์หลัก (Kim และคณะ, 2000; Chen และคณะ, 2012) แบคทีเรีย Propionibacteria มีการผลิตทั้ง 9CLA-1 และ 9CLA-2 เป็นไอโซเมอร์หลักโดยมีปริมาณ CLA (9CLAs) มากกว่า 70 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ของ CLA ทั้งหมด (Jiang และคณะ, 1998) และจาก

ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักของไทยเป็นแบคทีเรียไอโซเลตที่มีความจำเพาะในการผลิต 9CLA-1

4.1.3 อัตราการเปลี่ยนกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก

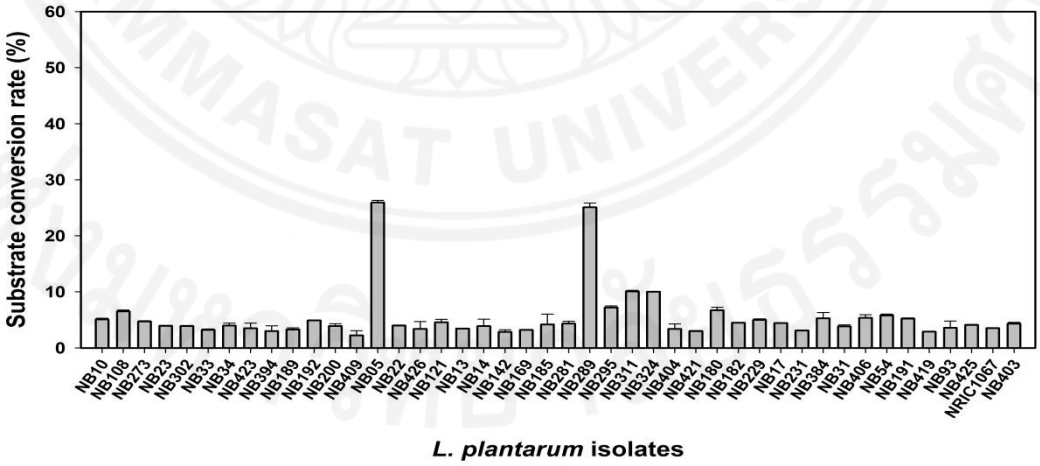
อัตราการเปลี่ยน LA เป็น CLA (substrate conversion rate (%)) คิดได้จากความเข้มข้นของกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมดที่เกิดจากกรดไขมันไลโนเลอิกที่พบอยู่ในส่วนใสของน้ำหมัก ซึ่งใช้อัตราการเปลี่ยนกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกเป็นดัชนีอ้างอิงถึงประสิทธิภาพการผลิต CLA ของไอโซเลตต่างๆ ของ *L. plantarum*

อัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA (%) ---------- (1)

$$(1) = \frac{\text{ความเข้มข้นของ CLA (μg/mL)} \times 100}{[\text{ความเข้มข้นของ CLA (μg/mL)} + \text{ความเข้มข้นของ LA (μg/mL)}]}$$

<u>ภาพที่ 4-12</u>

อัตราการเปลี่ยนกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ในน้ำหมักส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่เติม LA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (MMRS+LA) เป็นเวลา 36 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส



จากรูป 4-12 แสดงให้เห็นว่าไอโซเลตที่มีอัตราการเปลี่ยนกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกได้สูง ได้แก่ *L. plantarum* NB05 และ NB289 โดยมีอัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA เท่ากับ 25.9 และ 25.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการผลิต CLA ของทั้งสองไอโซเลต สำหรับไอโซเลต NB311 และ NB324 ที่มีความสามารถในการผลิต

CLA ได้รองลงมา พบว่ามีอัตราการเปลี่ยนกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก (อัตราการเปลี่ยนสับสเตรทเท่ากับ 10.1 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์) ได้มากกว่าไอโซเลตที่ไม่สามารถผลิต CLA หรือผลิตได้น้อย (มีค่าเฉลี่ยอัตราการเปลี่ยนในช่วง 3.0-7.0 เปอร์เซ็นต์) (ภาคผนวก ง-8)

4.2 การทดลองที่ II : การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิกต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจาก *L. plantarum* ที่คัดเลือกได้

จากผลการทดลองข้อ 4.1 สามารถคัดเลือกไอโซเลตแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกได้สูง 2 ไอโซเลต คือ *L. plantarum* NB05 และ NB289 ดังนั้น จึงเลือกจุลินทรีย์ 2 ไอโซเลตนี้มาทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิกต่อการเติบโตและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกโดยแปรผันค่าความเข้มข้นของ LA ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่เติม LA

4.2.1 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณการผลิต CLA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่คัดเลือก

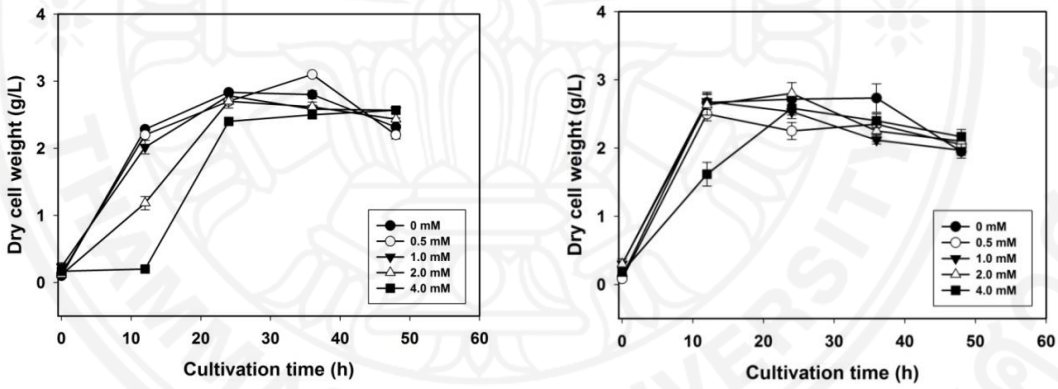
ความสามารถในการปรับตัวของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มี LA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิต CLA จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทส่งผลให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด อย่างไรก็ตามการผลิต CLA ของแต่ละไอโซเลตมีความแตกต่างกัน โดย *L. plantarum* ไอโซเลต NB05 ใช้ระยะเวลาในการปรับตัว (lag time) ที่ในการเติมโตนานกว่า *L. plantarum* ไอโซเลต NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MMRS ที่เติมสับสเตรท LA ที่ความเข้มข้น 2.0 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 4-13) อย่างไรก็ตาม ไม่พบระยะปรับตัวในการเติบโตของ *L. plantarum* ไอโซเลต NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมสับสเตรท LA ความเข้มข้น 0.5-2.0 มิลลิโมลาร์ แต่สามารถพบระยะปรับตัวในการเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสับสเตรท LA ที่ความเข้มข้นสูง (4.0 มิลลิโมลาร์) โดยน้ำหนักเซลล์แห้งของไอโซเลต NB05 มีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม LA เท่ากับ 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 36 ชั่วโมง (3.1 กรัมต่อลิตร) และไอโซเลต NB289 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.8 กรัมต่อลิตร เมื่อเติม LA เท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการรายงานของ Jiang และคณะ (1998); Kim และคณะ (2000); Alonso และคณะ (2003) ที่กล่าวว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารที่มีความเข้มข้นของสับสเตรท LA ที่มากเกินไปจะส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องมาจากความเป็นพิษของกรดไขมันไลโนเลอิก

นอกจากนี้ การผลิต CLA ของ *L. plantarum* ทั้งสองไอโซเลตให้ผลที่แตกต่างกันตามปริมาณความเข้มข้นของสับสเตรท LA ที่เติม โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรท LA จะส่งผลหรือมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมดหรือ total CLA ไปในทิศทางเดียวกัน โดยพบการผลิต CLA เพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของสับสเตรท LA ที่เพิ่มขึ้น ที่ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมของสับสเตรท LA ที่จะส่งเสริมการเพิ่มการผลิต CLA โดยความเข้มข้นของ LA ที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA นั้นขึ้นอยู่กับตามความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเมอร์ในการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ CLA

<u>ภาพที่ 4-13</u>

รูปแบบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MMRS ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก

ก) L. plantarum NB05 ข) L. plantarum NB289



ตารางที่ 4-4

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB05 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่แปรผันการเติม LA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม.

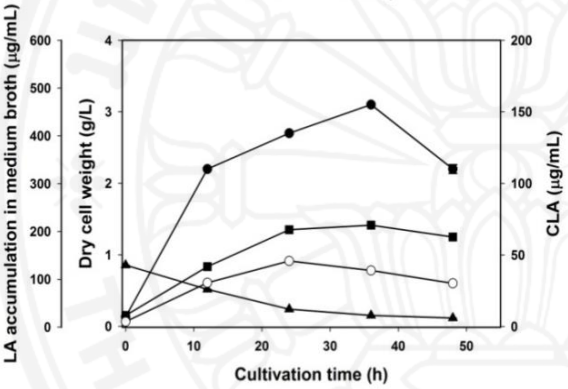
ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	ความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก (มิลลิโมลาร์)				
	ไม่เติม	0.5	1.0	2.0	4.0
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	9.5 ± 0.2	8.7 ± 0.1	8.8 ± 0.2	9.0 ± 0.5	9.1 ± 0.5
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	2.8 ± 0.1	3.1 ± 0.0	2.8 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.6 ± 0.1
ปริมาณ LA ที่สะสมในน้ำหมัก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.9 ± 0.0	19.0 ± 0.1	51.5 ± 0.3	126.6 ± 0.5	332.7 ± 2.0
CLA ทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	6.8 ± 0.1	70.8 ± 0.3	111.5 ± 0.5	152.2 ± 2.6	81.7 ± 1.9
ผลได้ของ CLA จากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	7.5 ± 0.2	28.4 ± 1.3	43.4 ± 1.2	62.6 ± 1.6	31.8 ± 1.5
ร้อยละของ CLA (% ของกรดไขมันทั้งหมด)	5.6 ± 0.1	33.0 ± 0.2	35.5 ± 0.5	30.2 ± 0.8	10.6 ± 0.5
อัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA (%)	-	77.0 ± 0.5	67.8 ± 0.1	54.0 ± 0.9	18.8 ± 1.1

<u>ภาพที่ 4-14</u>

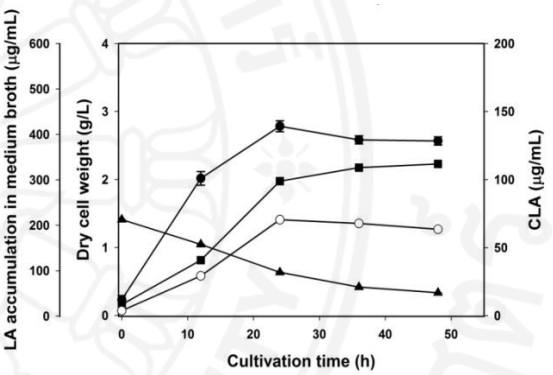
การผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB05 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหาร MMRS ที่แปรผันการเติมกรดไขมันไลโนเลอิก (ก) อาหาร MMRS ที่มี LA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (ข) อาหาร MMRS ที่มี LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ (ค) อาหาร MMRS ที่มี LA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ (ง) อาหาร MMRS ที่มี LA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์

(สัญลักษณ์ ● แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง ; สัญลักษณ์ ▲แทนกรดไขมันไลโนเลอิก สัญลักษณ์ ■ แทน total CLA ; สัญลักษณ์ ○ แทน 9CLA-1)

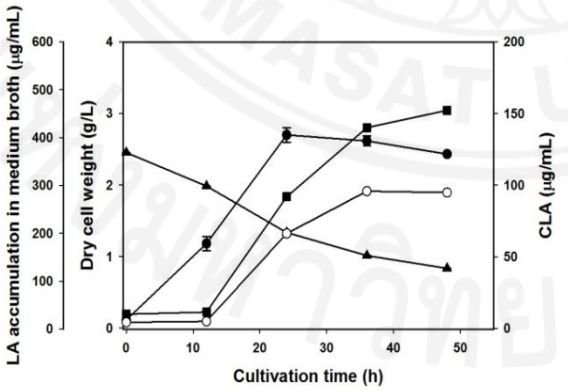
(ก) LA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์



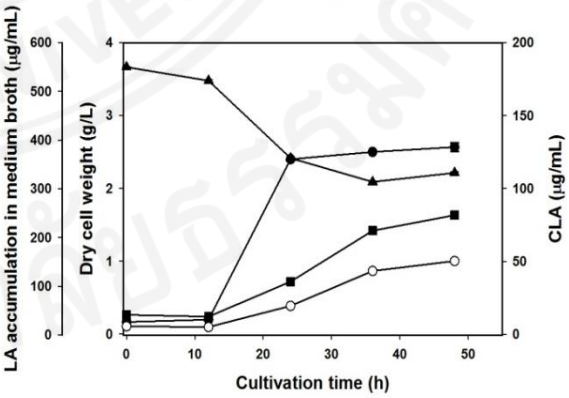
(ข) LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์



(ค) LA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์



(ง) LA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์



จากตารางที่ 4-4 และภาพที่ 4-14 พบว่า *L. plantarum* NB05 สามารถผลิต CLA ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 152.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่เติมสับสเตรท LA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ โดยให้ผลผลิตแต่ละไอโซเมอร์แตกต่างกัน ดังนี้คือสามารถผลิต 9CLA-1 ได้สูงสุดเท่ากับ 95.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS+LA ที่มีความเข้มข้นของ LA เท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง) แสดงข้อมูลในตารางภาคผนวก ง-9 สามารถผลิต 9CLA-2 ได้สูงสุด 51.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้นของ LA เท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 48 ชั่วโมง) และสามารถผลิต 10CLA ได้สูงสุด 3.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้นของ LA เท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 48 ชั่วโมง) โดยมีผลได้ของ CLA จากเซลล์หรือ$Y_{p/x}$ (62.6 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$) สูงสุดในอาหารที่มี LA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ความเข้มข้นอื่นๆ มีร้อยละของ CLA เท่ากับ 30.2 เปอร์เซ็นต์ในกรดไขมันทั้งหมด และมีอัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA 67.8 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นของ LA เท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 48 ชั่วโมง)

<u>ตารางที่ 4-5</u>

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่แปรผันการเติม LA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม.

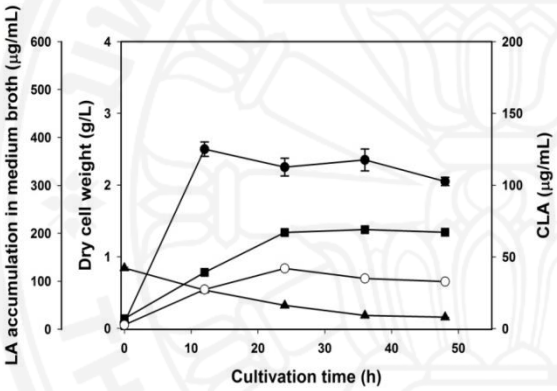
ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	ความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก (มิลลิโมลาร์)				
	ไม่เติม	0.5	1.0	2.0	4.0
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	7.6 ± 0.4	7.1 ± 0.1	7.1 ± 0.2	6.7 ± 0.5	6.9 ± 1.3
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	2.7 ± 0.2	2.5 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.6 ± 0.1
ปริมาณ LA ที่สะสมในน้ำหมัก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	1.4 ± 0.0	28.0 ± 0.2	73.8 ± 0.2	159.0 ± 2.3	319.9 ± 2.9
CLA ทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	7.5 ± 0.4	74.0 ± 0.2	112.9 ± 3.2	117.3 ± 1.5	69.5 ± 0.3
ผลได้ของ CLA จากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	3.9 ± 0.3	35.8 ± 1.0	53.7 ± 3.7	52.1 ± 4.2	29.9 ± 2.1
ร้อยละของ CLA (% ของกรดไขมันทั้งหมด)	4.8 ± 0.5	28.9 ± 0.9	36.4 ± 1.6	20.2 ± 0.6	8.4 ± 0.2
อัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA (%)	-	71.0 ± 0.6	58.7 ± 0.0	41.1 ± 0.8	18.2 ± 0.0

<u>ภาพที่ 4-15</u>

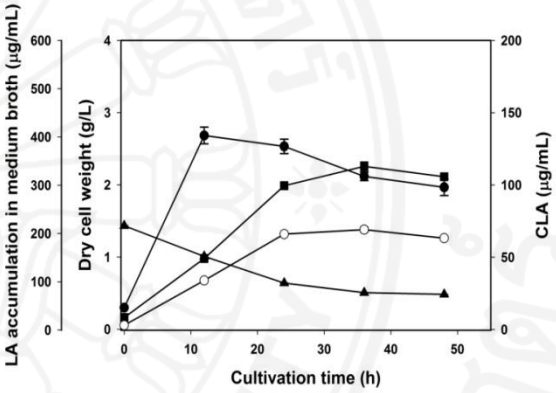
การผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB289 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหาร MMRS ที่แปรผันการเติมกรดไขมันไลโนเลอิก (ก) อาหาร MMRS ที่มี LA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (ข) อาหาร MMRS ที่มี LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ (ค) อาหาร MMRS ที่มี LA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ (ง) อาหาร MMRS ที่มี LA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์

(สัญลักษณ์● แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง ; สัญลักษณ์ ▲แทนกรดไขมันไลโนเลอิก ; สัญลักษณ์■ แทน total CLA ; สัญลักษณ์ ○ แทน 9CLA-1)

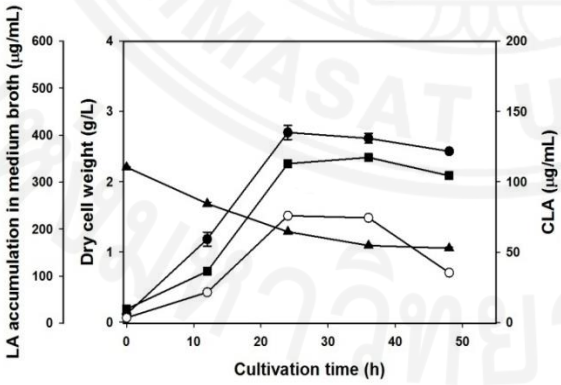
(ก) LA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์



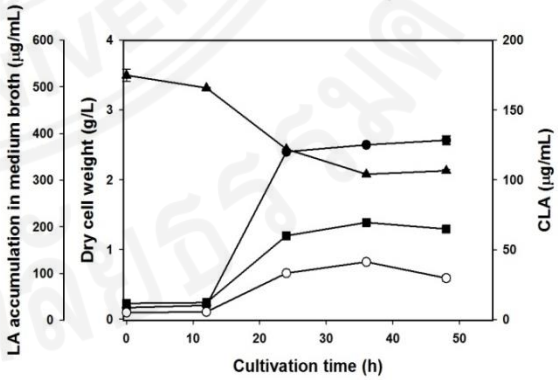
(ข) LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์



(ค) LA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์



(ง) LA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์



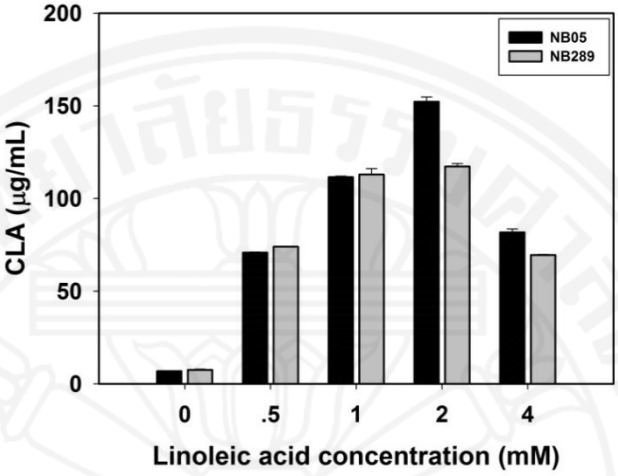
จากตารางที่ 4-5 และภาพที่ 4-15 พบว่า *L. plantarum* NB289 สามารถผลิต CLA ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 117.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหาร MMRS ที่เติมสับสเตรท LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ โดยให้ผลผลิตแต่ละไอโซเมอร์ที่แตกต่างกันดังนี้คือ สามารถผลิต 9CLA-1 ได้สูงสุดเท่ากับ 69.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS+LA ที่มีความเข้มข้น

เท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 36 ชั่วโมง) แสดงข้อมูลในตารางภาคผนวก ง-10 สามารถผลิต 9CLA-2 ได้สูงสุด 40.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ที่ความเข้มข้นของสับสเตรท LA เท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง) และสามารถผลิต 10CLA ได้สูงสุด 1.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ที่ความเข้มข้นของสับสเตรท LA เท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 36 ชั่วโมง) โดยมีผลได้ของ CLA จากเซลล์ หรือ$Y_{p/x}$ (53.7 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$) สูงสุดในอาหารที่มี LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ความเข้มข้นอื่นๆ มีร้อยละของ CLA เท่ากับ 36.4 เปอร์เซ็นต์ในกรดไขมันทั้งหมด และมีอัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA 58.7 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นของ LA เท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 48 ชั่วโมง)

เมื่อพิจารณาปริมาณ CLA ที่ผลิตได้, ผลได้ของ CLA จากเซลล์, ร้อยละของ CLA ในกรดไขมันทั้งหมด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS ที่แปรผันความเข้มข้นของ LA ต่างกัน พบว่าความเข้มข้นของ LA ที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลต (NB05 และ NB289) มีค่าความเข้มข้นของ LA ที่เหมาะสมแตกต่างกัน โดยความเข้มข้นของสับสเตรท LA ที่เหมาะสมสำหรับไอโซเลต NB05 มีค่าเท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์ ส่วนไอโซเลต NB289 มีค่าเท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์ โดยให้ผลผลิตปริมาณ CLA ทั้งหมด, ผลได้ของ CLA จากเซลล์และร้อยละของ CLA ในกรดไขมันทั้งหมดสูงสุด (ภาพที่ 4-16) อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ทั้งสองไอโซเลตให้ผลผลิต CLA ที่แตกต่างกันเนื่องจากความแตกต่างในความสามารถในการผลิตของแต่ละไอโซเลต โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB05 มีความสามารถในการผลิต CLA มากกว่าไอโซเลต NB289 จากการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสับสเตรทหรือกรดไขมันไลโนเลอิกส่งผลให้มีการผลิต CLA เพิ่มขึ้นแต่ในทางตรงกันข้ามการเจริญเติบโตของเซลล์มีค่าลดลงซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang และคณะ (2013) ที่พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิกส่งผลให้การผลิต CLA ค่อยๆ เพิ่มขึ้น แต่ความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิกที่เพิ่มขึ้นทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าลดลง (viable plate count)

ภาพที่ 4-16

เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิกต่อการผลิต
กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ทั้งสองไอโซเลต



4.2.2 การผลิต CLA แต่ละไอโซเมอร์ของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum*

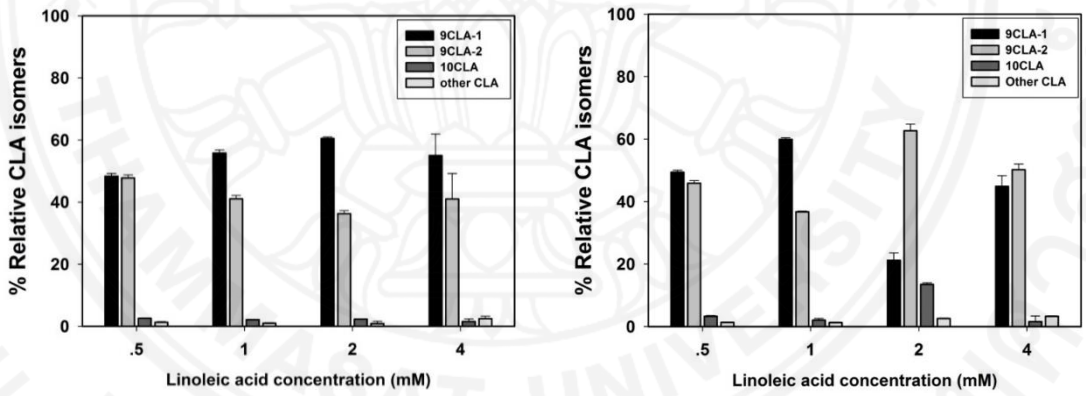
เมื่อพิจารณาชนิดของไอโซเมอร์ของ CLA ที่เซลล์ *L. plantarum* ผลิตได้และปริมาณ CLA ทั้งหมด (%) ในกรดไขมันทั้งหมด พบไอโซเมอร์ 9CLA-1, 9CLA-2, 10CLA และ CLA อื่นๆ จากผลการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยง *L. plantarum* NB05 ในอาหารที่เติมสับสเตรท LA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เชื้อสามารถผลิต 9CLA-1 ได้เป็นไอโซเมอร์หลัก (40-60 เปอร์เซ็นต์ของ CLA ทั้งหมด) และ 9CLA-2 เป็นไอโซเมอร์รอง (35-50 เปอร์เซ็นต์ของ CLA ทั้งหมด) ส่วนไอโซเมอร์ 10CLA และ CLA อื่นๆ พบได้ในปริมาณน้อย (0.3-2.1 เปอร์เซ็นต์) จากภาพที่ 4-17 (ก) แสดงให้เห็นว่าปริมาณ 9CLA-1 มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสับสเตรท LA (ยกเว้นความเข้มข้นของสับสเตรท LA เท่ากับ 4.0 มิลลิโมลาร์) ส่วน 9CLA-2 มีค่าคงที่ในช่วง 35-40 เปอร์เซ็นต์ของ CLA ทั้งหมด และเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* NB289 ในอาหารที่เติมสับสเตรท LA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าชนิดไอโซเมอร์ของ CLA ที่ผลิตได้คล้ายกับที่พบในไอโซเลต *L. plantarum* NB05 (ภาพที่ 4-17 (ข)) ยกเว้นการทดลองที่เติมสับสเตรท LA ความเข้มข้น 2.0 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ ที่พบปริมาณ 9CLA-2 มากกว่า 9CLA-1 และเมื่อใช้สับสเตรท LA ความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์พบว่ามีการลดลงของไอโซเมอร์ 9CLA-1 ซึ่งอาจจะเป็นผลจากการเปลี่ยน 9CLA-1 ไปเป็น 9CLA-2 (ดังภาพที่ 4-15 (ค)) หรือเกิดจากการเปลี่ยน CLA เป็นกรดไขมันอิ่มตัวเพิ่มมากขึ้น เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีปริมาณเซลล์หนาแน่นสูงหรือเมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยายาวนานมากขึ้น โดยสัดส่วนไอโซเมอร์ของ CLA จะเปลี่ยนแปลงเมื่อสภาวะในการทำปฏิกิริยาเปลี่ยนไป เช่น ความเข้มข้นของสับสเตรทที่ต่ำและ

ระยะเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยามากขึ้นส่งผลให้การผลิต 9CLA-2 เพิ่มขึ้น (Ando และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับสภาวะในการเปลี่ยนรูปไอโซเมอร์ของ 9CLA-1 ไปเป็น 9CLA-2 อย่างชัดเจน และจากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไอโซเมอร์ของ CLA เนื่องจากพบการเปลี่ยนแปลงในปริมาณของไอโซเมอร์ระหว่าง 9CLA-1 และ 9CLA2 ในแต่ละช่วงเวลาที่เพาะเลี้ยง โดยพบว่า 9CLA-2 มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงและปริมาณ CLA เริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 36-48 (ตารางภาคผนวก ง-15 และ ง-16)

<u>ภาพที่ 4-17</u>

สัดส่วนของแต่ละไอโซเมอร์ของกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลต NB05 และ NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(ก) L. plantarum NB05 (ข) L. plantarum NB289



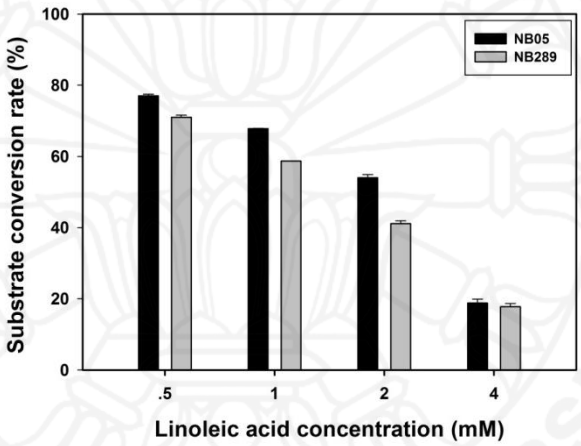
4.2.3 อัตราการเปลี่ยนกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก

อัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA มีค่าที่แตกต่างกันตามความสามารถของเชื้อ สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อเวลาเพาะเลี้ยงนานขึ้นอัตราการเปลี่ยน LA เป็น CLA ไอโซเมอร์ต่างๆ จะเพิ่มขึ้น แต่อัตราการเปลี่ยน LA เป็น CLA มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรท LA เพิ่มขึ้น (Jiang และคณะ,1998; Song และคณะ, 2005) ทั้งนี้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต NB05 มีอัตราการเปลี่ยน LA เป็น CLA มากกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต NB289 ในทุกความเข้มข้นของสับสเตรท LA ที่เติมไปในการเลี้ยงเชื้อ โดยทั้งสองไอโซเลตมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนรูปที่เพิ่มขึ้นในช่วงเวลาที่ 0-36 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง แต่มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยน LA เป็น CLA ที่ลดลงที่เวลา 36-48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง และเมื่อพิจารณาความเข้มข้น

ของสับสเตรท LA ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า เมื่อสับสเทรต LA มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นส่งผลให้อัตราการเปลี่ยนมีค่าลดลง แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต NB05 มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยน LA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ ไปเป็น CLA เท่ากับ 77, 68, 54 และ 19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าไอโซเลต NB289 ที่มีเปอร์เซ็นต์เปลี่ยน LA เป็น CLA เท่ากับ 71, 59, 40 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4-18)

ภาพที่ 4-18

อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้น LA ไปเป็นผลิตภัณฑ์ CLA ของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลต NB05 และ NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



4.3 การทดลองที่ III : การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจาก *L. plantarum* ที่คัดเลือกได้

4.3.1 อิทธิพลของค่าพีเอชต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณการผลิต CLA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่คัดเลือก

ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอชด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ให้ค่าพีเอชเริ่มต้นไม่ตรงตามค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอชด้วยสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3.5, 4.5 และ 5.5 ให้ค่าพีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.0, 5.5 และ 6.5 ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอชด้วยสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.5 และ 7.5 จะให้ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และ 7.5 (หลังจากการทำให้ปลอดเชื้อและถ่ายกล้าเชื้อลงสู่อาหาร) หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าพีเอชของอาหารมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องและคงที่อยู่ในช่วง 3.5-4.7 จนสิ้นสุดกระบวนเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4-20) ทั้งนี้พีเอชเริ่มต้นของ

อาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเติบโตของเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยง *L. plantarum* NB05 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ปรับพีเอช (พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.7) ส่งผลให้มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.5 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ในขณะที่ *L. plantarum* NB289 ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 จากผลการทดลองแสดงว่าค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการเติบโตของเซลล์ ถึงแม้ในขณะที่เซลล์เติบโตจะมีการสร้างกรดแลคติกออกสู่น้ำหมักจนทำให้ค่าพีเอชในอาหารลดลงอย่างรวดเร็วแต่เซลล์ก็ยังสามารถเติบโตและให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งใกล้เคียงกัน

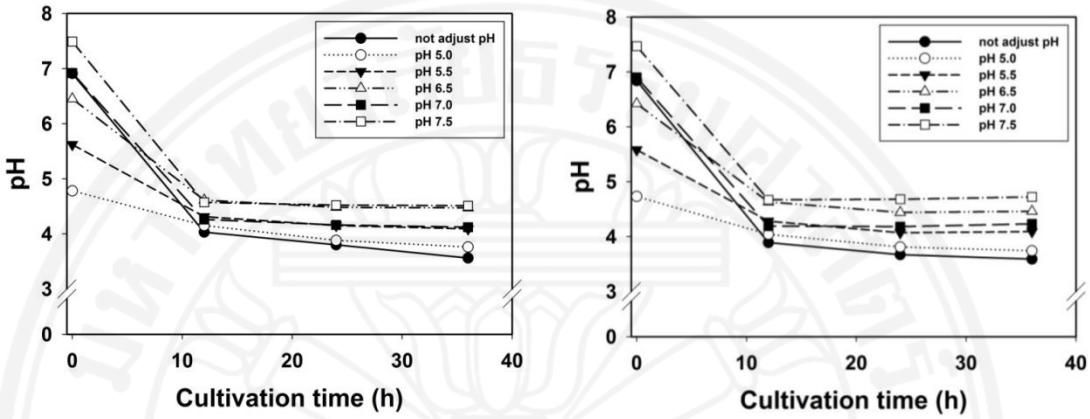
สำหรับอิทธิพลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต *L. plantarum* NB05 และ NB289 ให้ผลผลิตไอโซเมอร์ของ CLA ดังนี้ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 ให้ค่าความเข้มข้นของ 9CLA-1 เท่ากับ 28.4 และ 41.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ค่าความเข้มข้นของ 9CLA-2 ได้สูงสุด เท่ากับ 25.5 และ 51.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Troegeler-Meynadier และคณะ (2003) ที่กล่าวว่าการผลิต CLA ในระบบที่มีค่าพีเอชสูง (~7) สามารถผลิตได้มากกว่าระบบที่มีค่าพีเอชต่ำ (~6) เนื่องจากที่พีเอชต่ำมีผลยับยั้งการ isomerization หรือการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA แต่การผลิตไอโซเมอร์ 10CLA ให้ผลความเข้มข้นสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารพีเอชเริ่มต้นต่างออกไป โดย *L. plantarum* NB05 ให้ความเข้มข้นของ 10CLA สูงสุดที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 (เท่ากับ 5.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วน *L. plantarum* NB289 ให้ความเข้มข้นของ 10CLA สูงสุดที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 5.5 (เท่ากับ 6.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเมื่อพิจารณาผลรวมของการผลิต CLA แต่ละไอโซเมอร์ พบว่ามีแนวโน้มการผลิตไอโซเมอร์ 9CLA-1 และ 9CLA-2 เพิ่มขึ้นไปในทางเดียวกัน จึงส่งผลให้ total CLA มีค่าสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 นอกจากนี้เมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่มีการปรับค่าพีเอชเริ่มต้น (พีเอช 6.7) พบว่าปริมาณการผลิต CLA มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วงที่เป็นกลาง (7.0-7.5) เนื่องจากระบบบัฟเฟอร์ช่วยให้พีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างช้าๆ ทำให้เซลล์สามารถผลิต CLA ได้เพิ่มมากขึ้น โดย *L. plantarum* NB05 ให้ความเข้มข้นของ total CLA (59.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) น้อยกว่า *L. plantarum* NB289 (102.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาพที่ 4-20) ซึ่ง *L. plantarum* NB289 สามารถผลิต CLA ส่วนใหญ่อยู่ในรูปไอโซเมอร์ 9CLA-2 หรือ *trans*-9, *trans*-11 (51.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มากกว่าไอโซเมอร์ 9CLA-1 หรือ *cis*-9, *trans*-11 (41.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยไอโซเมอร์ *trans*, *trans* นี้ยังไม่มีการรายงานหรือยืนยันถึงคุณสมบัติที่มีประโยชน์ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่าสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการนำไปผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกถ้าเป้าหมายหลักของผลผลิตคือไอโซเมอร์ 9CLA-1 และในการทดลองนี้สามารถตรวจพบการผลิต

9CLA-1 มากกว่า 9CLA-2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 และ 5.5 สำหรับ *L. plantarum* NB05 สามารถตรวจพบการผลิตไอโซเมอร์ 9CLA-1 ได้มากกว่าไอโซเมอร์ 9CLA-2 เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และ 6.5 (ตารางที่ 4-6 และ 4-7) และเมื่อวิเคราะห์ผลได้ของผลิตภัณฑ์กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกต่อเซลล์หรือ $Y_{p/x}$ พบว่าให้ผลสอดคล้องกับความเข้มข้นของ CLA ที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 โดยค่า $Y_{p/x}$ สูงสุดของไอโซเลต *L. plantarum* NB05 มีค่าเท่ากับ 19.9 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$ และไอโซเลต *L. plantarum* NB289 มีค่าเท่ากับ 36.6 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$ จากผลการทดลองพบว่าค่าพีเอชมีผลต่อการผลิต CLA โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน NB05 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่ผลิต CLA ได้สูงที่สุด แต่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ปรับค่าพีเอชให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่ค่าต่างๆ พบว่าการผลิต CLA กลับลดลงเมื่อใช้ปริมาณสับสเตรท LA ที่เท่ากับการทดลองก่อนหน้า (ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์) ในขณะที่ไอโซเลต NB289 ที่สามารถผลิต CLA ได้สูงเป็นลำดับที่สอง สามารถผลิต CLA ได้ปริมาณใกล้เคียงกับการทดลองก่อนหน้านั้น แต่ไอโซเมอร์ของ CLA ที่ผลิตได้ส่วนใหญ่อยู่ 9CLA-2 มากกว่า 9CLA-1 ดังนั้นจึงพบว่า ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อการผลิต CLA ในไอโซเลต NB05 มากกว่าไอโซเลต NB289 นอกจากนี้ค่าพีเอชเริ่มต้นมีผลต่อชนิดไอโซเมอร์ของ CLA เนื่องจากอิทธิพลของพีเอชส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ LAI ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการไบโอไฮโดรจิเนชั่นของ LA รวมถึงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อ (AbuGhazaleh และ Jacobson, 2007; Troegeler-Meynadier และคณะ, 2003; Chen และคณะ, 2012; Li และคณะ, 2013) นอกจากนี้ มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องได้รายงานถึงอิทธิพลของพีเอชต่อการเปลี่ยน CLA ไปเป็นไอโซเมอร์ต่างๆ ซึ่งได้รายงานว่าการผลิต 9CLA-1 ให้ได้ปริมาณสูงจำเป็นต้องเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ LAI เช่น Li และคณะ (2013) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *L. acidophilus* F0221 ในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกันในช่วง 6.0-7.5 และพบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เซลล์สามารถผลิต 9CLA-1 ได้มากที่สุด (105.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาคือที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 และ 8.5 (81.05 และ 76.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ดังนั้น เห็นได้ว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ LAI ในการผลิต CLA (9CLA-1) อยู่ในช่วงที่กว้าง และค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA ยังขึ้นอยู่กับชนิดของไอโซเลตจุลินทรีย์ด้วย เช่น *Clostridium sporogenes* ATCC 25762 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 7.5 ส่วน *B. fibrisolvens* A38, *Propionibacterium acnes*strain ATCC 6919 และ *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* CCRC 11076 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 7.0 และ *L. acidophilus* CCRC 14079 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 5.0 (Kepler และ Tove, 1976; Lin และคณะ, 2002; Peng และคณะ, 2007 และ Li และคณะ, 2013)

ภาพที่ 4-19

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นด้วยบัฟเฟอร์ที่ระยะเวลาต่างๆ

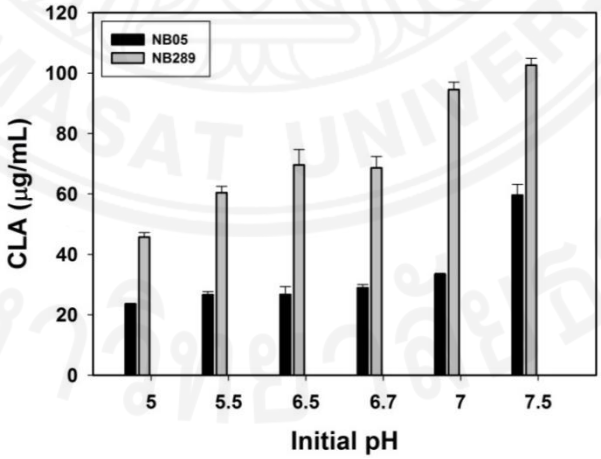
(ก) *L. plantarum* NB05 (ข) *L. plantarum*NB289



ภาพที่ 4-20

ผลของพีเอชต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติก

ไอโซเลต *L. plantarum* NB05 และ NB289



ตารางที่ 4-6

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB05 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่แปรผันค่าพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชม.

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	พีเอชเริ่มต้นในระยะการผลิต					
	ตัวควบคุม	พีเอช 5.0	พีเอช 5.5	พีเอช 6.5	พีเอช 7.0	พีเอช 7.5
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	3.5 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.1	3.3 ± 0.1	2.7 ± 0.1	3.0 ± 0.2
กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	26.7 ± 2.6	23.5 ± 0.3	26.6 ± 1.1	28.9 ± 1.1	33.3 ± 0.4	59.6 ± 3.6
ไอโซเมอร์ 9CLA-1 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	13.1 ± 0.4	11.0 ± 0.0	9.0 ± 0.5	6.5 ± 0.3	15.2 ± 0.1	28.4 ± 2.2
ไอโซเมอร์ 9CLA-2 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	8.0 ± 0.2	6.4 ± 0.3	11.0 ± 0.2	16.6 ± 0.8	13.2 ± 0.3	25.5 ± 1.2
ไอโซเมอร์ 10CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	5.3 ± 2.4	5.8 ± 0.1	5.6 ± 0.5	5.4 ± 0.3	4.2 ± 0.4	3.7 ± 0.5
ผลได้ของ CLA จากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	7.6 ± 0.9	8.5 ± 0.5	9.5 ± 0.7	8.8 ± 0.6	12.3 ± 0.6	19.9 ± 2.5
กรดไขมันทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	301.8 ± 6.1	319.3 ± 3.4	327.8 ± 27.9	358.3 ± 51.7	337.9 ± 1.7	346.7 ± 24.8
ผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	85.4 ± 3.6	116.1 ± 6.8	117.1 ± 13.2	108.6 ± 19.0	125.1 ± 34.9	115.6 ± 16.0
ร้อยละของ CLA (% ของกรดไขมันทั้งหมด)	8.8 ± 1.0	7.4 ± 0.2	8.1 ± 1.0	8.1 ± 1.5	9.9 ± 2.5	17.2 ± 2.3
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	32.4 ± 2.4	26.9 ± 0.3	41.9 ± 1.0	72.6 ± 0.9	43.6 ± 0.3	51.6 ± 1.0

หมายเหตุ : ตัวควบคุมมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.7

ตารางที่ 4-7

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่แปรผันค่าพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชม.

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	พีเอชเริ่มต้นในระยะการผลิต					
	ตัวควบคุม	พีเอช 5.0	พีเอช 5.5	พีเอช 6.5	พีเอช 7.0	พีเอช 7.5
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	2.8 ± 0.1	2.2 ± 0.2	2.8 ± 0.2	3.0 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.8 ± 0.2
กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	69.6 ± 5.1	45.7 ± 1.5	60.4 ± 2.1	68.6 ± 3.8	94.5 ± 2.5	102.6 ± 2.3
ไอโซเมอร์ 9CLA-1 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	30.5 ± 3.4	24.1 ± 0.9	28.7 ± 1.2	24.0 ± 3.2	38.0 ± 1.8	41.5 ± 0.4
ไอโซเมอร์ 9CLA-2 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	32.3 ± 0.9	15.1 ± 0.6	22.4 ± 0.6	36.1 ± 1.2	47.9 ± 0.3	51.5 ± 0.3
ไอโซเมอร์ 10CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	5.8 ± 1.0	5.5 ± 0.1	6.7 ± 0.2	6.0 ± 0.1	4.6 ± 0.8	4.5 ± 0.3
ผลได้ของ CLA จากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	24.9 ± 2.5	20.8 ± 2.6	21.6 ± 2.3	22.9 ± 1.8	33.8 ± 3.3	36.6 ± 3.4
กรดไขมันทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	373.9 ± 12.3	409.7 ± 21.0	457.4 ± 15.4	390.9 ± 18.8	495.3 ± 54.4	523.3 ± 4.0
ผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	133.5 ± 8.0	186.2 ± 26.5	163.4 ± 17.2	130.3 ± 9.6	176.9 ± 32.1	186.9 ± 14.8
ร้อยละของ CLA (% ของกรดไขมันทั้งหมด)	18.6 ± 2.0	11.2 ± 0.9	13.2 ± 0.9	17.5 ± 1.8	19.1 ± 2.6	19.6 ± 0.6
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	65.7 ± 1.1	40.7 ± 0.9	52.5 ± 1.4	71.9 ± 2.1	62.0 ± 0.3	63.6 ± 1.4

หมายเหตุ : ตัวควบคุมมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.7

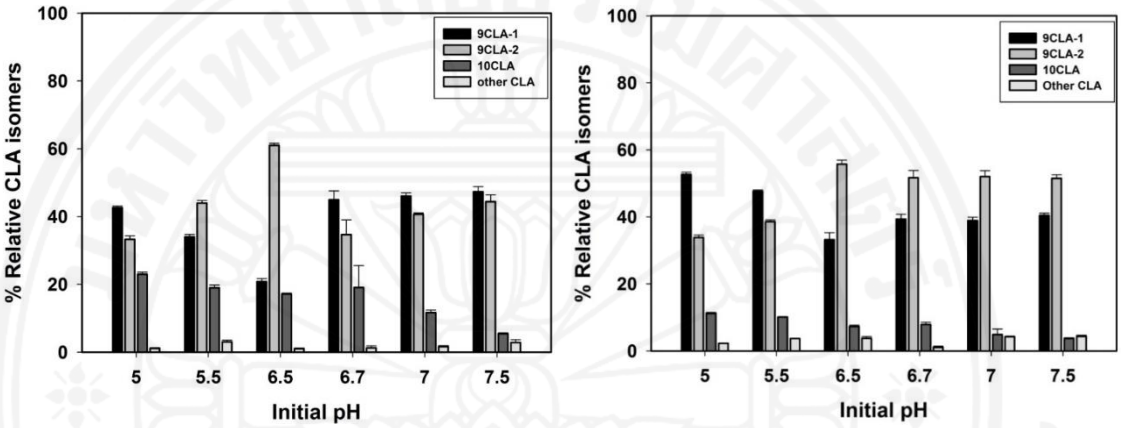
4.3.2 อิทธิพลของพีเอชต่อไอโซเมอร์ของ CLA ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum*

จากภาพที่ 4-21 (ก) พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* ในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0, 7.0, 7.5 และอาหารที่ไม่มีการปรับพีเอช (พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.7) พบว่า *L. plantarum* NB05 สามารถผลิต 9CLA-1 ได้เป็นไอโซเมอร์หลัก (42.6-47.3 เปอร์เซ็นต์ของ CLA ทั้งหมด) รองลงมาคือ 9CLA-2 (33.3-44.4 เปอร์เซ็นต์ของ CLA ทั้งหมด) ถัดมาคือไอโซเมอร์ 10CLA (5.4-23.0 เปอร์เซ็นต์ของ CLA ทั้งหมด) ส่วน CLA อื่นๆพบได้น้อย (1.1-2.9 เปอร์เซ็นต์ของ CLA ทั้งหมด) อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และ 6.5 พบว่าเซลล์สามารถผลิต 9CLA-2 ได้เป็นไอโซเมอร์หลัก (44.0-61.0 เปอร์เซ็นต์ของ CLA ทั้งหมด)โดยสัดส่วนของไอโซเมอร์ 9CLA-1 และ 9CLA-2 มีค่าใกล้เคียงกัน ส่วน *L. plantarum* NB289 สามารถผลิตไอโซเมอร์ 9CLA-2 เป็นไอโซเมอร์หลักและมีค่ามากกว่าไอโซเลต NB05 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5-7.5 โดยสัดส่วนไอโซเมอร์มีค่าไม่แตกต่างกัน ประกอบด้วย 9CLA-1 ประมาณ 33.2-47.6 เปอร์เซ็นต์, 9CLA-2 ประมาณ 38.6-55.7 เปอร์เซ็นต์, 10CLA ประมาณ 3.7-10.1 เปอร์เซ็นต์, และ CLA อื่นๆ ประมาณ 3.7-4.4 เปอร์เซ็นต์ของ CLA ทั้งหมดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นที่ 5.5-7.5 ที่เวลา 36 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-21 (ข) และ ตารางภาคผนวก ง-22, ง-23) โดยผลการทดลองดังกล่าวไม่สอดคลองกับงานวิจัยของ Li และคณะ (2013) และ Choi และคณะ (2005) ที่กล่าวว่าการผลิต 9CLA-1 มีค่าลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอชต่ำ (5.5) เนื่องจากพีเอชที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ LAI มีค่าลดลง อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงที่พีเอชต่ำกว่า 5.0 เซลล์สามารถผลิต 10CLA ได้เพิ่มขึ้น

ภาพที่ 4-21

ผลของพีเอชต่อไอโซเมอร์ของกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

(ก) L. plantarum NB05 (ข) L. plantarum NB289

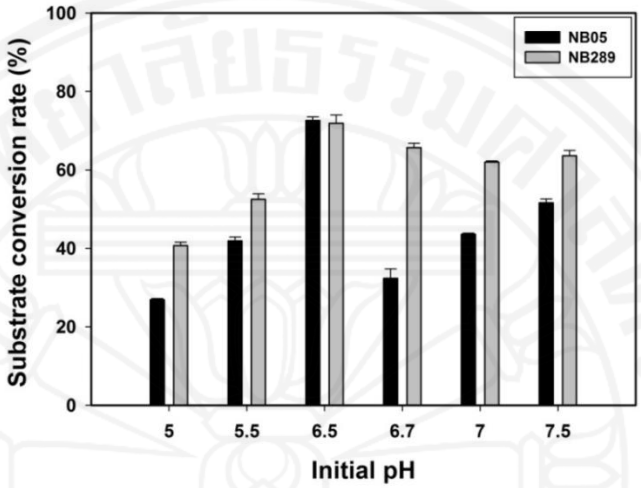


4.3.3 อัตราการเปลี่ยนกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ด-ไลโนเลอิก

จาก 4.3.1 แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตมีอัตราการเปลี่ยน LA เป็น CLA ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 โดยไอโซเลต NB05 มีค่าอัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA สูงสุดเท่ากับ 72.6 เปอร์เซ็นต์ (28.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และไอโซเลต NB289 มีค่าเท่ากับ 71.9 เปอร์เซ็นต์ (68.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างไรก็ตาม จากภาพที่ 4-22 พบว่าอัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA โดยเฉลี่ยของไอโซเลต NB289 มีค่าสูงกว่าไอโซเลต NB05 ในทุกค่าพีเอช ยกเว้นที่พีเอช 6.5 ที่มีอัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA ใกล้เคียงกัน โดยแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต NB05 มีอัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA ที่ให้ปริมาณ 9CLA-1 สูงสุด (6.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เท่ากับ 37.8 เปอร์เซ็นต์, ปริมาณ 9CLA-2 สูงสุด (16.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีค่าเท่ากับ 59.9 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณ 10CLA สูงสุด (5.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีค่าเท่ากับ 33.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าอัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA น้อยกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต NB289 ให้ปริมาณ 9CLA-1 สูงสุด (24.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เท่ากับ 47.5 เปอร์เซ็นต์, ปริมาณ 9CLA-2 สูงสุด (36.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เท่ากับ 57.0 เปอร์เซ็นต์และปริมาณ 10CLA สูงสุด (6.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เท่ากับ 18.1 % (ตารางภาคผนวก ง-24 และ ง-25)

ภาพที่ 4-22

ผลของพีเอชต่ออัตราการเปลี่ยนกรดไขมันไลโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลต NB05 และ NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



4.4 การทดลองที่ IV : การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้อิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองเป็นสับสเตรทเพื่อผลิต CLA

การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้อิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองเป็นสับสเตรทในการผลิต CLA เพื่อลดต้นทุนในการผลิต CLA เนื่องจากสับสเตรท LA ในรูปกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ที่ใช้มีราคาค่อนข้างสูงซึ่งอาจไม่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้จริงในอุตสาหกรรม ดังนั้นการศึกษาการใช้สับสเตรทที่มีราคาถูกจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งงานวิจัยนี้ได้นำน้ำมันถั่วเหลืองที่หาได้ในท้องตลาดมาใช้เพื่อทำอิมัลชั่นด้วยการเติมอิมัลซิไฟเออร์ (tween 80 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์) เพื่อให้น้ำมันสามารถละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับอาหารเลี้ยงเชื้อ และหลังจากผสมอิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองในอาหารเหลว MMRS พบว่าอาหารมีความขุ่นแตกต่างกันตามความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง ด้วยเหตุนี้จึงไม่สามารถติดตามผลการเติบโตโดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ได้ ดังนั้นจึงติดตามเฉพาะการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยพีเอชของอาหารมีค่าลดลงจาก 6.6 เป็น 3.6 หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และคงที่ที่พีเอช 3.5-3.6 จนสิ้นสุดกระบวนการ เมื่อนำตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์กรดไขมันที่ผลิตได้ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่าการใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นสับสเตรทไม่สามารถตรวจพบผลิต CLA ในน้ำหมัก โดยพบเพียงกรดไขมันโอเลอิก (18:1) กรดไขมันไลโนเลอิก (18:2) และกรดไขมันแอลฟา-ไลโนเลนิก (18:3) (ที่มาจากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันถั่วเหลือง) นอกจากนี้ เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทุกช่วงเวลา

ควบคู่กับการวิเคราะห์การผลิต CLA ในอาหารที่เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเหลว MMRS ที่เติมสับสเตรท LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์) พบว่า เซลล์สามารถการผลิต CLA ได้เป็นปกติ (ภาพที่ 4-23) แต่การผลิต CLA ในอาหารที่เติมอิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่พบ การผลิต CLA เนื่องจากอิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้ในการศึกษามีปริมาณ LA ที่มากเกินไปไม่เหมาะสมต่อการผลิตหรือยับยั้งการผลิต CLA ของทั้งสองไอโซเลต ซึ่งปริมาณ LA ของอิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองมีปริมาณ LA สูงกว่า LA ที่พบในอาหารตัวควบคุมเชิงบวกที่เวลา 0 ชั่วโมง (212.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลายเท่าตัวแม้จะเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 72 ชั่วโมงแล้วก็ตาม (ตารางที่ 4-8) สอดคล้องกับรายงานของ Xu และคณะ (2004) ที่ทำการศึกษาการผลิต CLA ด้วยโพรไบโอติกแบคทีเรียในนมโดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านและไม่ผ่านการไฮโดรไลซ์เป็นสับสเตรท พบว่าเซลล์สามารถผลิต CLA ได้ดีในนมที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ ส่วนน้ำมันที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลซ์ไม่พบการผลิต CLA ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันที่ยังไม่ผ่านการไฮโดรไลซ์ยังคงอยู่ในรูปไตรกรีเซอไรด์ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกไม่สามารถนำไปใช้ในการผลิต CLA ได้ จากงานวิจัยต่างๆ พบว่าแบคทีเรียจะสามารถผลิต CLA ได้เมื่อสับสเตรท LA ที่ใช้อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระหรือ free fatty acid (Jiang และคณะ, 1998; Lin และคณะ, 1999; Kishino และคณะ, 2002) เนื่องจากเอนไซม์ LAI เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันไลโนเลอิกอิสระ (free linoleic acid) (Kepler และ Tove, 1969; Christie และคณะ, 1997) และยังไม่มีรายงานการใช้น้ำมันในรูป fatty acid methyl ester หรือ FAME เป็นสับสเตรทในการผลิต CLA ดังนั้นจึงไม่พบการผลิต CLA จากแบคทีเรียกรดแลคติกเมื่อใช้อิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองแสดงให้เห็นว่าควรใช้กรดไขมันไลโนเลอิกในรูปอิสระเป็นสับสเตรท

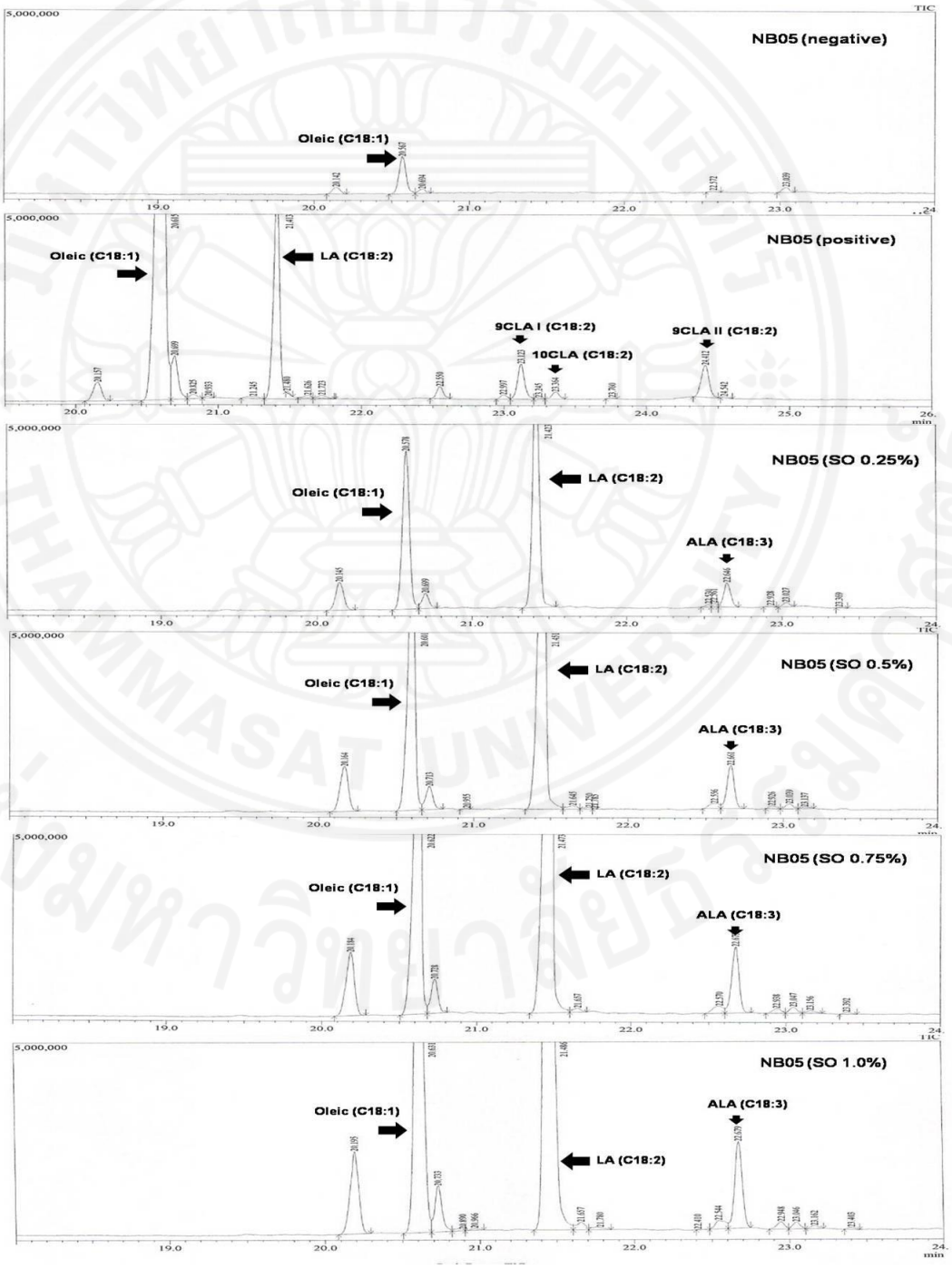
<u>ตารางที่ 4-8</u>

ปริมาณ LA คงเหลือในส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหาร MMRS ที่เติมอิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 0 และ 72 ชั่วโมง

ชนิดและความเข้มข้นของสับสเตรท	ปริมาณ LA คงเหลือในส่วนใสแต่ละช่วงเวลา (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	0 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
LA (1.0 mM)	212.6 ± 0.2	30.4 ± 0.6
SO 0.25% (w/v)	-	875.5 ± 32.8
SO 0.5% (w/v)	-	1,493.6 ± 267.8
SO 0.75% (w/v)	-	2,227 ± 150.5
SO 0.1% (w/v)	-	3,034 ± 167.0

<u>ภาพที่ 4-23</u>

โครมาโตแกรมแสดงชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำหมักของ *L. plantarum* NB05 ที่เพาะเลี้ยงใน (ก) อาหารเหลว MMRS (ตัวควบคุมเชิงลบ) (ข) อาหารเหลว MMRS ที่เติม LA 1.0 มิลลิโมลาร์ (ตัวควบคุมเชิงบวก) (ค, ง, จ และ ฉ) อาหารเหลว MMRS ที่เติมอิมัลชั่นของน้ำมัน-ถั่วเหลืองความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์



4.5 การทดลองที่ V : การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

4.5.1. อิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum*

(1) การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 และมีการเติมกรดไขมันไลโนเลอิกความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase)

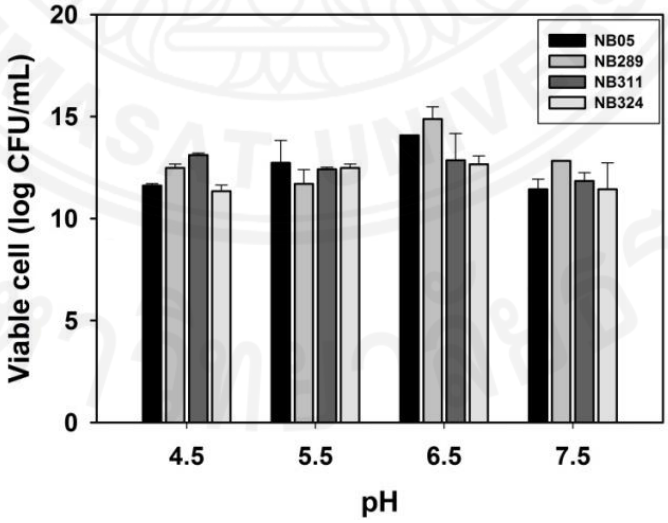
จากผลการทดลองพบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum*ไอโซเลต NB05, NB311 และ NB324 คือพีเอช 6.5 โดยให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.5, 0.5 และ 0.6 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.4, 5.1 และ 4.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนไอโซเลต NB289 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเท่ากับ 5.5 ซึ่งมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.4 ต่อชั่วโมง และค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.4 กรัมต่อลิตร เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเข้าสู่ระยะเติบโตคงที่พบว่า จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ในช่วง 10^{11} - 10^{14} โคโลนีต่อมิลลิลิตร หรือ 12-15 ล็อคโคโลนีต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือช่วง 5.5-6.5 และสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่เป็นกรดเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Fu และ Mathews (1999) ที่รายงานว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *L. plantarum* อยู่ในช่วงพีเอช 5.0-6.0 และ *L. plantarum* ที่เลี้ยงในอาหาร MRS สามารถเติบโตได้ดีที่พีเอชในช่วง 5.5-6.5 (Soto, 2013)

เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่จึงทำการเติบสับสเตรท LA เข้าสู่ระบบ ทั้งนี้ผู้วิจัยเลือกเติม LA ในระยะที่เซลล์เจริญเติบโตจนมีความเข้มข้นของเซลล์สูง เพื่อหลีกเลี่ยงการยับยั้งการเจริญเติบโตเนื่องจาก LA (Partanen และคณะ, 2001; Kankaanpää และคณะ, 2004; Desbois และ Smith, 2010) โดยจากผลการศึกษาพบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA ของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลต NB05, NB311 และ NB324 คือพีเอช 5.5 ซึ่งให้ผลผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมด (total CLA) เท่ากับ 114.5, 22.6 และ 28.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากการเติม LA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ยกเว้นไอโซเลต *L. plantarum* NB289 ที่สามารถผลิต total CLA ได้ไม่แตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.5 และ 6.5 (41.1 และ 44.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากการเติม LA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6.5 มีอัตราการผลิต CLA (0.8 ไมโครกรัมต่อลิตร.ชั่วโมง) และมีสัดส่วนปริมาณไอโซเมอร์ 9CLA-1 มากกว่าที่พีเอช 5.5 ไอโซเลต NB289 จึงมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA ที่พีเอช 6.5 และเมื่อพิจารณาจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตมีค่าลดลงเหลือประมาณ 10^{6} - 10^{7} โคโลนี

ต่อมิลลิลิตรหรือ 5.0-9.3 ล็อคโคโลนีต่อมิลลิลิตรซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Alonso และคณะ (2003) ที่กล่าวว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิต CLA ได้สูงเมื่อเซลล์อยู่ในระยะสุดท้ายของการเพิ่มจำนวน (Late log phase) จนถึงช่วงต้นของระยะคงที่ (early stationary phase) และยังสามารถผลิต CLA ได้มากที่สุดเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) (Lin และคณะ, 1999) รวมทั้งการผลิต CLA สามารถเกิดขึ้นได้แม้ว่าเซลล์อยู่ในสภาวะคงที่ (มีการทำงานลดลงหรือความมีชีวิตของเซลล์ลดลง) เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ LAI ไม่จำเป็นต้องใช้ cofactor หรือแหล่งพลังงานอื่นมาช่วยในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA (Chen และคณะ, 2012) นอกจากนี้พีเอชที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิต CLA ของแต่ละไอโซเลตมีค่าที่ใกล้เคียงกัน โดย *L. plantarum* ไอโซเลต NB289, NB311 และ NB324 ที่เลี้ยงที่ค่าพีเอช 4.5 และ 7.5 ไม่เหมาะสมต่อการผลิต CLA แตกต่างจาก *L. plantarum* ไอโซเลต NB05 ที่ไม่สามารถผลิต CLA ได้ที่พีเอช 6.5 และ 7.5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นไอโซเลต NB05 มีความชอบสภาวะกรดมากกว่าหรือทนสภาวะกรดได้ดีกว่าไอโซเลตอื่น

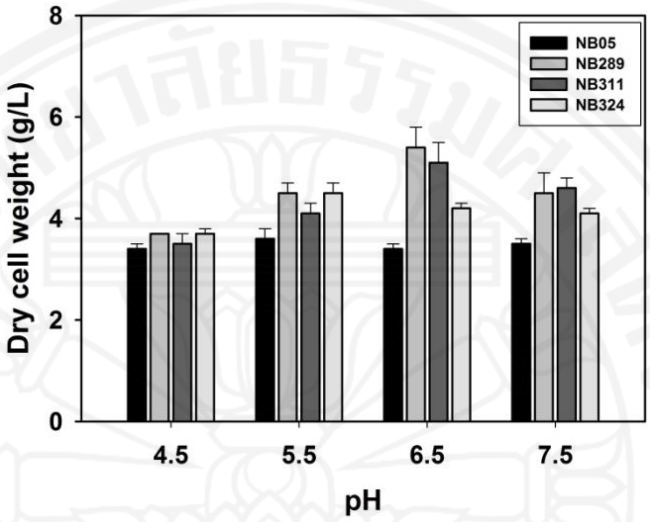
<u>ภาพที่ 4-24</u>

อิทธิพลของพีเอชต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลตที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่



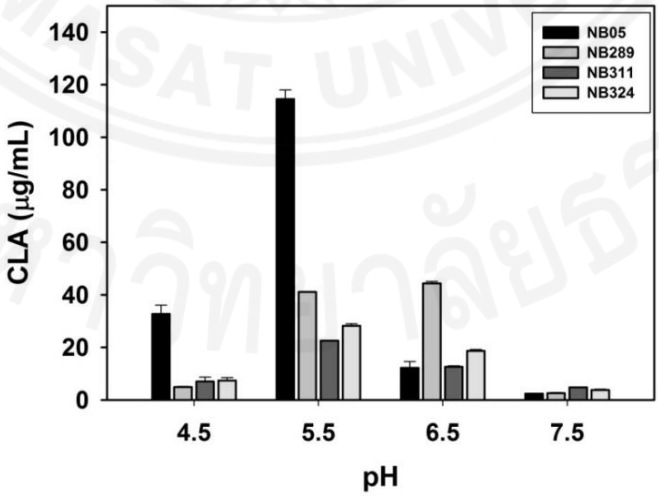
ภาพที่ 4-25

อิทธิพลของพีเอชต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลตที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่



ภาพที่ 4-26

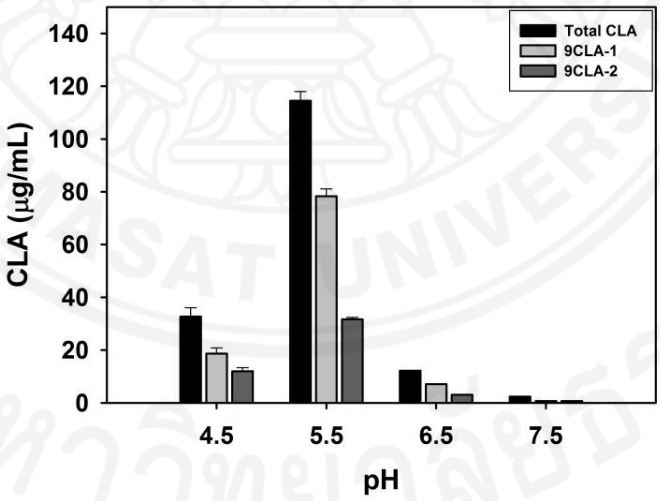
อิทธิพลของพีเอชต่อการผลิต CLA ของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลตที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่



จากภาพที่ 4-26 แสดงให้เห็นว่า *L. plantarum* NB05 เป็นไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิต CLA ได้สูงที่สุดโดยให้ผลผลิต total CLA เท่ากับ 114.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่พีเอช 5.5 โดยให้อัตราการผลิต CLA สูงสุด 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.ชั่วโมง ผลผลิตไอโซเมอร์ 9CLA-1 สูงถึง 70-80 เปอร์เซ็นต์ของ CLA ทั้งหมด (78.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และให้ 9CLA-2 ที่ 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นไอโซเมอร์รอง (31.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ตารางที่ 4-9) ไอโซเลต NB05 เป็นไอโซเลตที่มีความเสถียรในการผลิตCLA เมื่อเทียบกับการศึกษาในระดับหลอดทดลอง (จากข้อ 4.2) ซึ่งหากเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรท LA ให้เท่ากับความเข้มข้นของ LA ที่เหมาะสมของไอโซเลตนี้ (2.0 มิลลิโมลาร์) คาดว่าน่าจะได้ผลผลิต CLA ปริมาณสูงเพิ่มขึ้น ดังนั้น *L. plantarum* NB05 จึงเป็นไอโซเลตที่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหรือทำการศึกษาต่อเพื่อพัฒนากระบวนการผลิต CLA ให้มีประสิทธิภาพต่อไป

<u>ภาพที่ 4-27</u>

อิทธิพลของพีเอชต่อการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB05 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่



ตารางที่ 4-9

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB05 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	พีเอชที่ควบคุม			
	พีเอช 4.5	พีเอช 5.5	พีเอช 6.5	พีเอช 7.5
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	3.4 ± 0.1	3.6 ± 0.2	3.4 ± 0.1	3.5 ± 0.1
จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ล็อค โคโลนีต่อมิลลิลิตร)	11.6 ± 0.1	12.7 ± 1.1	14.1 ± 0.0	11.4 ± 0.5
อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0
กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	32.7 ± 3.4	114.5 ± 3.5	12.2 ± 0.1	2.4 ± 0.1
ไอโซเมอร์ 9CLA-1 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	18.7 ± 2.1	78.3 ± 2.8	7.1 ± 0.0	0.7 ± 0.0
ไอโซเมอร์ 9CLA-2 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	12.0 ± 1.3	31.7 ± 0.7	3.1 ± 0.1	0.7 ± 0.0
ไอโซเมอร์ 10CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	1.3 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.0	0.9 ± 0.1
ผลได้ของ CLA จากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	10.7 ± 1.3	42.1 ± 3.1	4.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
กรดไขมันทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	369.5 ± 2.0	346.8 ± 9.9	260.7 ± 5.0	220.8 ± 5.9
ผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	121.4 ± 7.4	127.4 ± 2.6	102.0 ± 8.5	75.0 ± 7.7
ร้อยละของ CLA (% ของกรดไขมันทั้งหมด)	8.9 ± 6.4	33.0 ± 4.0	4.7 ± 1.2	1.1 ± 0.1
อัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA (%)	20.2 ± 0.6	69.4 ± 0.1	21.1 ± 0.2	1.6 ± 0.0
อัตราการผลิต CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.ชั่วโมง)	0.6	2.0	0.2	0.04
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	57.5	56.0	56.0	57.5
ระยะการเจริญก่อนการเหนี่ยวนำ (ชั่วโมง)	9.5	8.0	8.0	9.5

ตารางที่ 4-10

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	พีเอชที่ควบคุม			
	พีเอช 4.5	พีเอช 5.5	พีเอช 6.5	พีเอช 7.5
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	3.7 ± 0.0	4.5 ± 0.2	5.4 ± 0.4	4.5 ± 0.4
จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ล็อค โคโลนีต่อมิลลิลิตร)	12.5 ± 0.2	11.7 ± 0.7	14.9 ± 0.6	12.8 ± 0.0
อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	4.9 ± 0.3	41.1 ± 0.0	44.4 ± 0.7	2.6 ± 0.2
ไอโซเมอร์ 9CLA-1 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	1.1 ± 0.1	28.1 ± 0.1	35.1 ± 0.2	0.9 ± 0.1
ไอโซเมอร์ 9CLA-2 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	2.5 ± 0.0	10.7 ± 0.1	7.5 ± 0.2	0.8 ± 0.0
ไอโซเมอร์ 10CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.9 ± 0.2
ผลได้ของ CLA จากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	1.8 ± 0.2	13.2 ± 0.7	11.1 ± 0.7	0.7 ± 0.1
กรดไขมันทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	451.4 ± 2.5	342.4 ± 11.3	344.4 ± 73.0	326.7 ± 4.0
ผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	162.2 ± 14.1	109.7 ± 18.2	86.5 ± 7.1	92.5 ± 7.6
ร้อยละของ CLA (% ของกรดไขมันทั้งหมด)	1.1 ± 0.4	12.0 ± 0.4	12.9 ± 2.9	0.8 ± 0.1
อัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA (%)	2.2 ± 0.1	19.7 ± 0.2	30.2 ± 0.2	1.0 ± 0.1
อัตราการผลิต CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.ชั่วโมง)	0.09	0.7	0.8	0.05
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	57.5	56.0	56.0	57.5
ระยะการเจริญก่อนการเหนี่ยวนำ (ชั่วโมง)	9.5	8.0	8.0	9.5

ตารางที่ 4-11

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB324 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติมสับสเตรทLA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	พีเอชที่ควบคุม			
	พีเอช 4.5	พีเอช 5.5	พีเอช 6.5	พีเอช 7.5
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	3.7 ± 0.1	4.5 ± 0.2	4.2 ± 0.1	4.1 ± 0.1
จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ล็อค โคโลนีต่อมิลลิลิตร)	11.3 ± 0.3	12.5 ± 0.2	12.7 ± 0.4	11.4 ± 1.3
อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.0
กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	7.4 ± 1.1	28.2 ± 0.8	18.7 ± 0.5	3.8 ± 0.3
ไอโซเมอร์ 9CLA-1 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	2.4 ± 0.8	21.8 ± 0.6	12.4 ± 0.2	1.4 ± 0.0
ไอโซเมอร์ 9CLA-2 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	4.1 ± 0.2	4.8 ± 0.2	4.2 ± 0.3	1.1 ± 0.0
ไอโซเมอร์ 10CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	1.1 ± 0.1	1.6 ± 0.3	2.1 ± 0.0	1.3 ± 0.2
ผลได้ของ CLA จากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	2.4 ± 0.1	8.2 ± 0.6	6.2 ± 0.2	1.1 ± 0.0
กรดไขมันทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	472.0 ± 0.2	354.3 ± 9.6	375.9 ± 9.5	373.6 ± 5.8
ผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	162.8 ± 5.5	102.5 ± 6.4	125.8 ± 8.7	105.4 ± 5.6
ร้อยละของ CLA (% ของกรดไขมันทั้งหมด)	2.0± 0.4	8.0 ± 1.0	5.0 ± 1.1	1.2 ± 0.1
อัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA (%)	4.3 ± 0.5	15.1 ± 0.2	12.1 ± 0.3	1.7 ± 0.2
อัตราการผลิต CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.ชั่วโมง)	0.1	0.5	0.3	0.07
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	58.0	55.0	55.0	56.0
ระยะการเจริญก่อนการเหนี่ยวนำ (ชั่วโมง)	10.0	7.0	7.0	8.0

ตารางที่ 4-12

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB311 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่

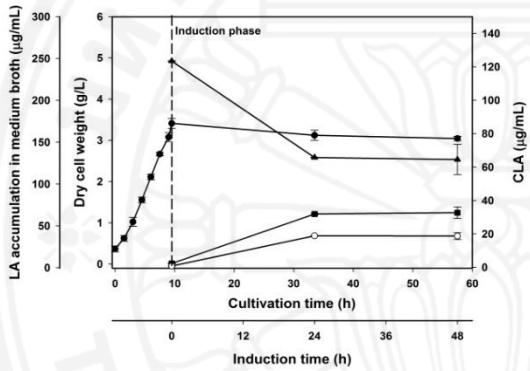
ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	พีเอชที่ควบคุม			
	พีเอช 4.5	พีเอช 5.5	พีเอช 6.5	พีเอช 7.5
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	3.5 ± 0.2	4.1 ± 0.2	5.1 ± 0.4	4.6 ± 0.2
จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ล็อค โคโลนีต่อมิลลิลิตร)	13.1 ± 0.1	12.4 ± 0.1	12.9 ± 1.3	11.8 ± 0.4
อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0
กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	7.0 ± 1.7	22.6 ± 0.1	12.6 ± 0.4	4.8 ± 0.1
ไอโซเมอร์ 9CLA-1 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	2.3 ± 0.9	16.1 ± 0.0	7.7 ± 0.2	1.7± 0.0
ไอโซเมอร์ 9CLA-2 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	3.2 ± 0.5	5.1 ± 0.1	3.0 ± 0.4	1.5 ± 0.0
ไอโซเมอร์ 10CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.0	1.9 ± 0.2	1.6 ± 0.0
ผลได้ของ CLA จากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	2.5 ± 0.7	7.5 ± 0.5	3.8 ± 0.3	1.4 ± 0.1
กรดไขมันทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	472.0 ± 0.2	354.3 ± 9.6	375.9 ± 9.5	373.6 ± 5.8
ผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	437.0 ± 9.5	341.6 ± 0.3	360.3 ± 7.1	316.8 ± 5.7
ร้อยละของ CLA (% ของกรดไขมันทั้งหมด)	1.6± 0.7	6.6± 0.0	3.5± 0.3	1.5 ± 0.0
อัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA (%)	4.2± 1.1	11.5 ± 0.0	8.1± 0.2	2.6± 0.0
อัตราการผลิต CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.ชั่วโมง)	0.1	0.4	0.2	0.09
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	57.0	55.0	54.5	56.0
ระยะการเจริญก่อนการเหนี่ยวนำ (ชั่วโมง)	9.0	7.0	6.5	8.0

<u>ภาพที่ 4-28</u>

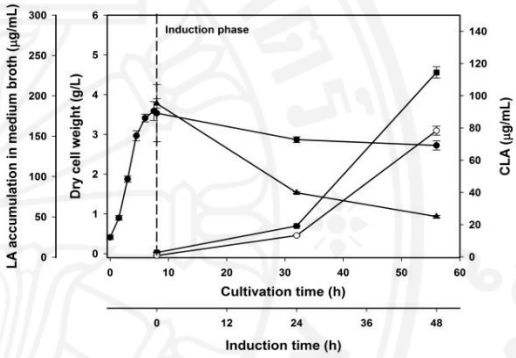
รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB05 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ โดย (ก) พีเอช 4.5 (ข) พีเอช 5.5 (ค) พีเอช 6.5 และ(ง) พีเอช 7.5

(สัญลักษณ์ ● แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง ; สัญลักษณ์ ▲ แทนกรดไขมันไลโนเลอิก ; สัญลักษณ์ ■ แทน totalCLA ; สัญลักษณ์ ○แทน 9CLA-1; สัญลักษณ์ --- (เส้นประ) แทนช่วงเวลาในการเติม LA)

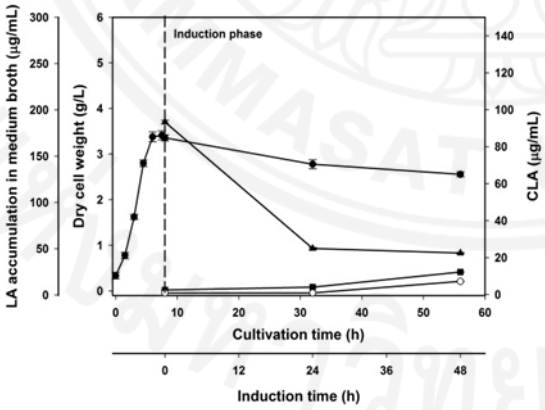
(ก) พีเอช 4.5



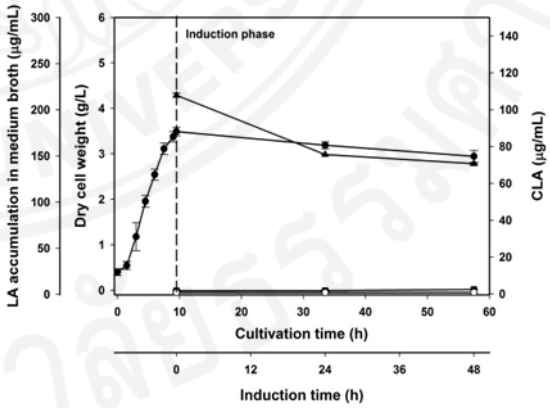
(ข) พีเอช 5.5



(ค) พีเอช 6.5



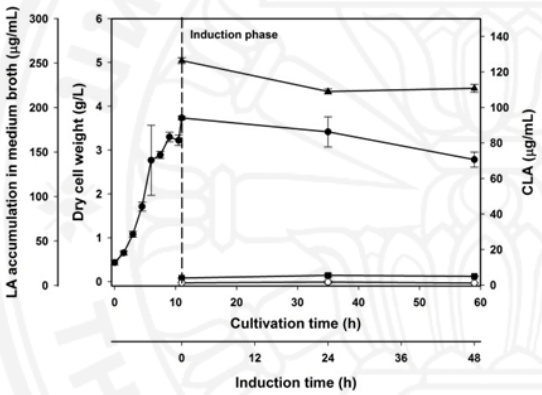
(ง) พีเอช 7.5



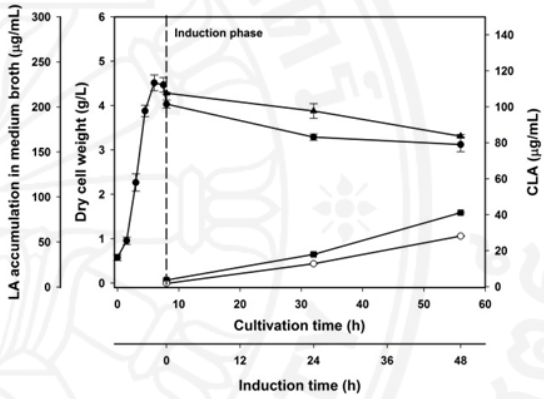
ภาพที่ 4-29

รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ โดย (ก) พีเอช 4.5 (ข) พีเอช 5.5 (ค) พีเอช 6.5 และ(ง) พีเอช 7.5 (สัญลักษณ์ ● แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง ; สัญลักษณ์ ▲ แทนกรดไขมันไลโนเลอิก ; สัญลักษณ์ ■ แทน totalCLA ; สัญลักษณ์ ○ แทน 9CLA-1; สัญลักษณ์ --- (เส้นประ) แทนช่วงเวลาในการเติม LA)

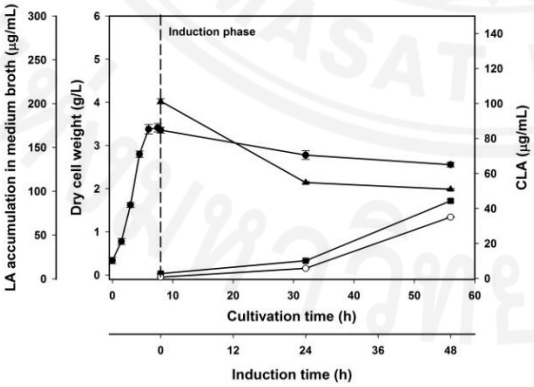
(ก) พีเอช 4.5



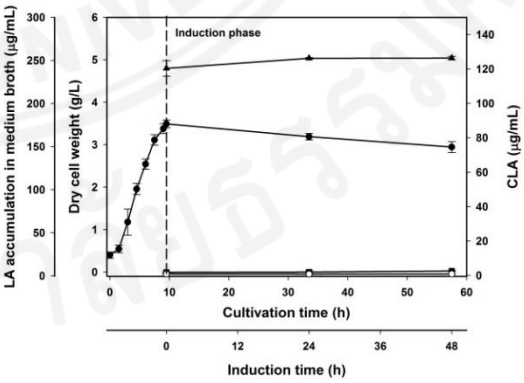
(ข) พีเอช 5.5



(ค) พีเอช 6.5



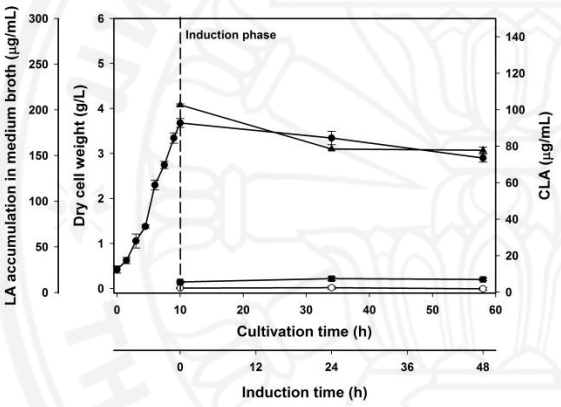
(ง) พีเอช 7.5



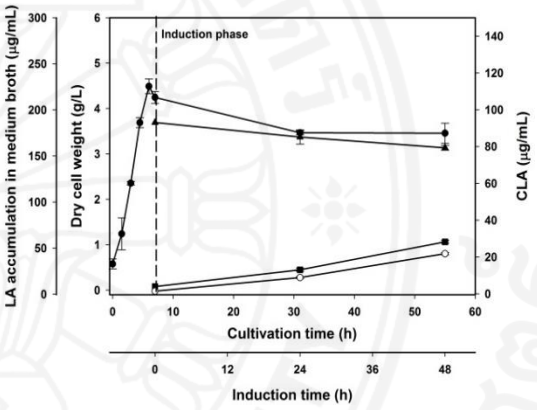
<u>ภาพที่ 4-30</u>

รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB324 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ โดย (ก) พีเอช 4.5 (ข) พีเอช 5.5 (ค) พีเอช 6.5 และ(ง) พีเอช 7.5 (สัญลักษณ์ ● แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง ; สัญลักษณ์ ▲ แทนกรดไขมันไลโนเลอิก ; สัญลักษณ์ ■ แทน totalCLA ; สัญลักษณ์ ○ แทน 9CLA-1; สัญลักษณ์ --- (เส้นประ) แทนช่วงเวลาในการเติม LA)

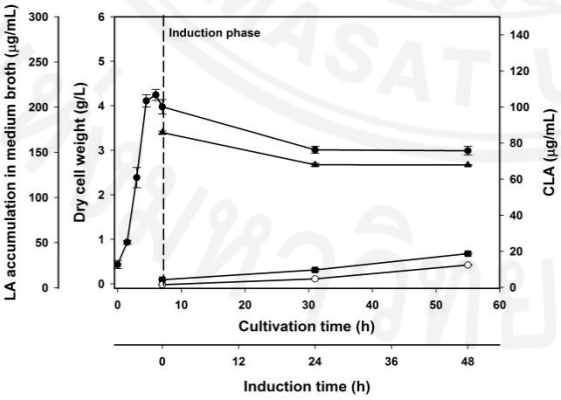
(ก) พีเอช 4.5



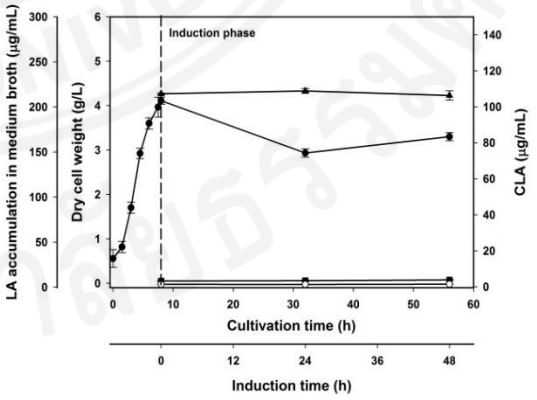
(ข) พีเอช 5.5



(ค) พีเอช 6.5



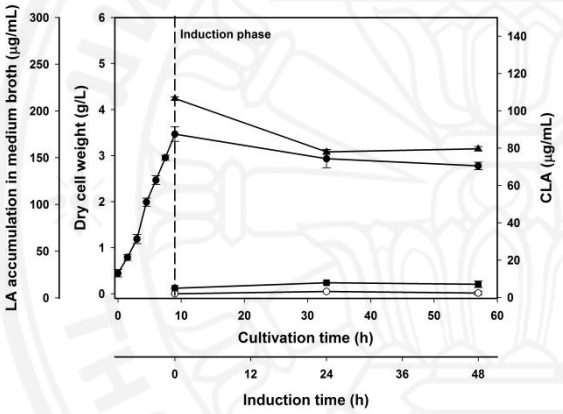
(ง) พีเอช 7.5



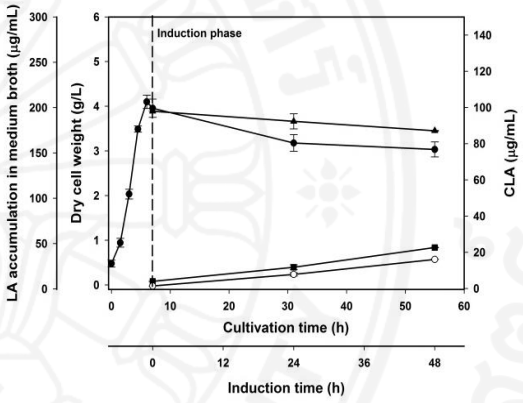
<u>ภาพที่ 4-31</u>

รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB311 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ โดย (ก) พีเอช 4.5 (ข) พีเอช 5.5 (ค) พีเอช 6.5 และ(ง) พีเอช 7.5 (สัญลักษณ์ ● แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง ; สัญลักษณ์ ▲ แทนกรดไขมันไลโนเลอิก ; สัญลักษณ์ ■ แทน totalCLA ; สัญลักษณ์ ○ แทน 9CLA-1; สัญลักษณ์ --- (เส้นประ) แทนช่วงเวลาในการเติม LA)

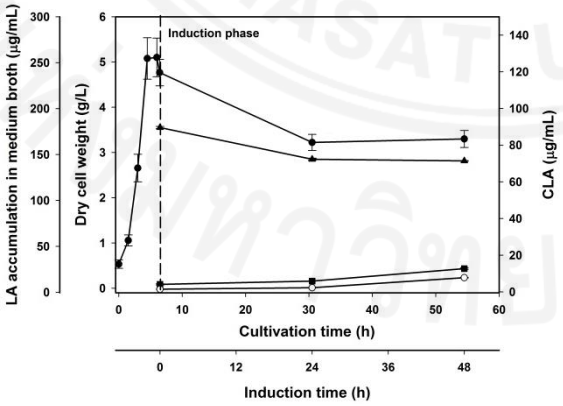
(ก) พีเอช 4.5



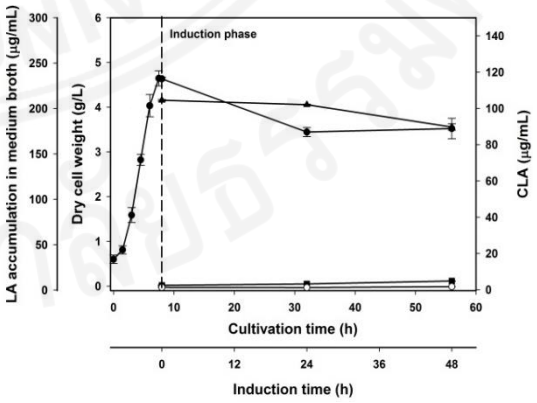
(ข) พีเอช 5.5



(ค) พีเอช 6.5



(ง) พีเอช 7.5



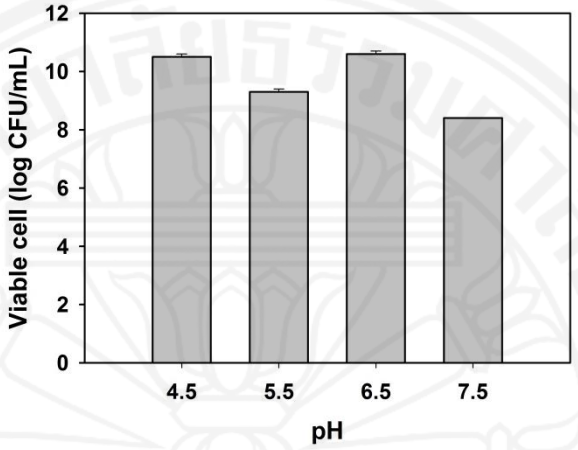
(2) การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 และเติมกรดไขมันไลโนเลอิกความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลต NB289

ผลการทดลองพบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลต NB289 คือพีเอช 5.5 โดยให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.5 ต่อชั่วโมง มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตประมาณ 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร หรือ 12 ล็อคโคโลนีต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-32) และน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเท่ากับ 4.2 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-33) สำหรับค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิต CLA มีค่าพีเอชควบคุมที่ 5.5 โดยให้ปริมาณ total CLA สูงสุดเท่ากับ 103.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-34), อัตราการผลิต CLA สูงสุด 1.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร. ชั่วโมง, ผลได้ของ CLA จากเซลล์สูงสุด 35.7 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$, ร้อยละของ CLA สูงสุด 36.5 เปอร์เซ็นต์ในกรดไขมันทั้งหมด และมีอัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA สูงถึง 94.1 เปอร์เซ็นต์เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ (ตารางที่ 4-13) โดยพบค่าพีเอชที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิต CLA คือพีเอช 7.5 เนื่องจากเซลล์มีการเติบโตที่ช้าและให้ผลผลิต CLA น้อยที่สุด (แบคทีเรียใช้เวลาปรับตัวหรือมีระยะ lag phase นาน ซึ่งอาจเกิดจากพีเอชที่เป็นด่างและถูกยับยั้งจากสับสเตรทที่เติมตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง)

ทั้งนี้การเติมสับสเตรท LA ในช่วงเวลาที่ต่างกันมีผลต่อปริมาณการผลิต CLA โดยการเติมสับสเตรท LA ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง จะมีระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ LAI ในการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA ที่นานกว่า (6.5-9 ชั่วโมง) การเติม LA เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ โดยการเติม LA ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยงสามารถผลิต CLA ได้มากกว่าการเติมสับสเตรทเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ (ที่พีเอช 5.5-6.5 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA ของไอโซเลต NB289) แต่อย่างไรก็ตาม CLA ที่ผลิตได้มีปริมาณไอโซเมอร์ 9CLA-2 มากกว่า 9CLA-1 จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการรายงานของ Gorissen และคณะ (2011) ที่พบว่าการเพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงไม่สามารถเพิ่มปริมาณการผลิต CLA ได้ โดยระยะเวลาที่นานเกินไปอาจส่งผลทำให้ปริมาณ 9CLA-1 ที่ผลิตได้ลดลงหรือเปลี่ยนรูปไอโซเมอร์ไปเป็น 9CLA-2 หรือเป็นสารตั้งต้นตัวใหม่ให้เชื้อผลิต CLA ไอโซเมอร์อื่นๆ แทน

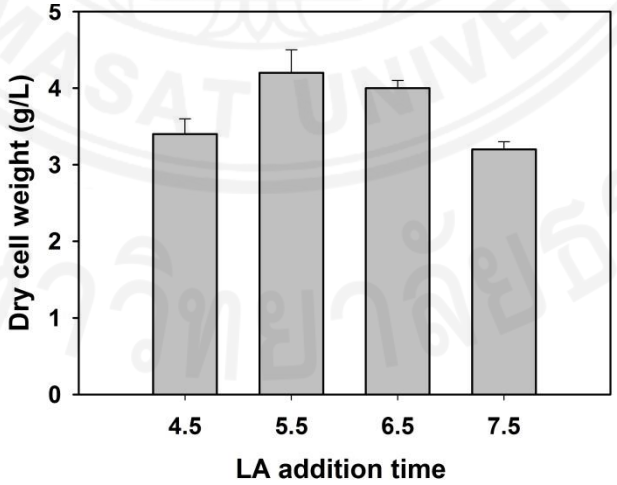
ภาพที่ 4-32

อิทธิพลของพีเอชต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. plantarum* NB289 ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง



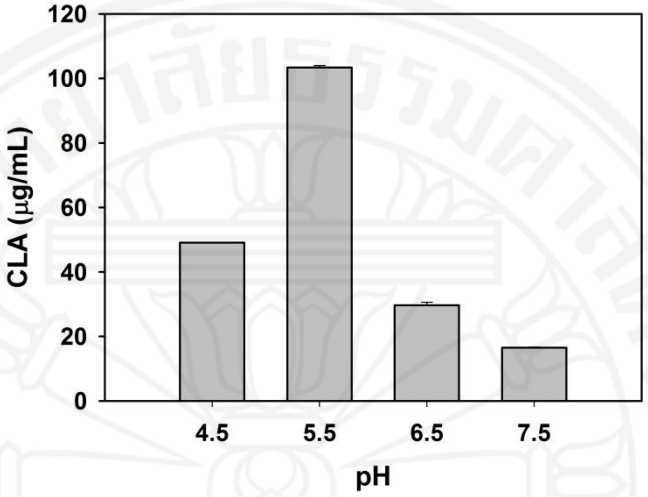
ภาพที่ 4-33

อิทธิพลของพีเอชต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *L. plantarum* NB289 ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4-34

อิทธิพลของพีเอชต่อการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง



ตารางที่ 4-13

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง

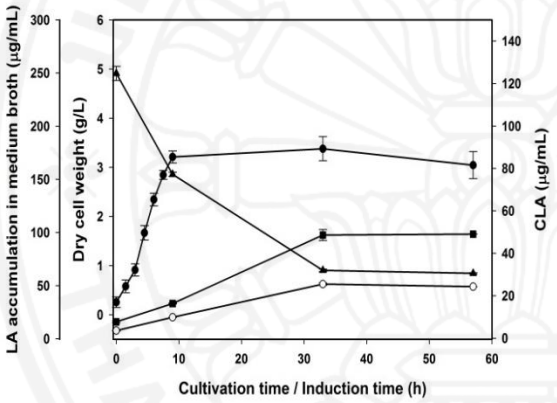
ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	พีเอชที่ควบคุม			
	พีเอช 4.5	พีเอช 5.5	พีเอช 6.5	พีเอช 7.5
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	3.4± 0.2	4.2 ± 0.3	4.0 ± 0.1	3.2 ± 0.1
จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ล็อค โคโลนีต่อมิลลิลิตร)	10.5 ± 0.1	9.3 ± 0.1	10.6 ± 0.1	8.4 ± 0.0
อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0
กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	49.1 ± 0.0	103.4 ± 0.6	29.7 ± 0.9	16.5 ± 0.2
ไอโซเมอร์ 9CLA-1 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	24.3 ± 0.0	28.1 ± 0.2	6.4 ± 0.2	6.3 ± 0.0
ไอโซเมอร์ 9CLA-2 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	19.6 ± 0.0	69.8 ± 0.9	18.3 ± 0.6	4.6 ± 0.2
ไอโซเมอร์ 10CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	3.3 ± 0.0	3.9 ± 0.0	4.9 ± 0.0	5.2 ± 0.0
ผลได้ของ CLA จากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	16.4 ± 1.6	35.7 ± 1.4	10.6 ± 0.7	5.7 ± 0.3
กรดไขมันทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	451.4 ± 2.5	342.4 ± 1.3	344.4 ± 3.0	416.6 ± 1.3
ผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	123.4 ± 4.8	97.7 ± 4.3	59.8 ± 3.4	143.7± 6.8
ร้อยละของ CLA (% ของกรดไขมันทั้งหมด)	13.3 ± 0.3	36.5 ± 0.6	17.7 ± 0.9	4.0 ± 1.2
อัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA (%)	44.3 ± 0.2	94.1 ± 0.1	80.6 ± 0.5	21.9 ± 0.0
อัตราการผลิต CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.ชั่วโมง)	0.9	1.9	0.5	0.3
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	57.0	55.5	55.5	59.0
ระยะการเจริญก่อนการเหนี่ยวนำ (ชั่วโมง)	9.0	7.5	7.5	11.0

<u>ภาพที่ 4-35</u>

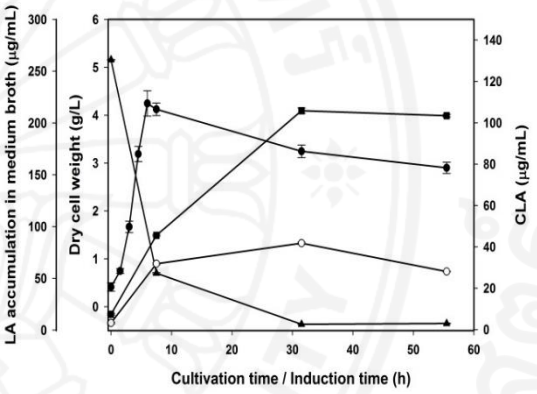
รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมัก โดย (ก) พีเอช 4.5 (ข) พีเอช 5.5 (ค) พีเอช 6.5 และ (ง) พีเอช 7.5

(สัญลักษณ์ ● แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง ; สัญลักษณ์ ▲ แทนกรดไขมันไลโนเลอิก ; สัญลักษณ์ ■ แทน totalCLA ; สัญลักษณ์ O แทน 9CLA-1 ; สัญลักษณ์ --- (เส้นประ) แทนช่วงเวลาในการเติม LA)

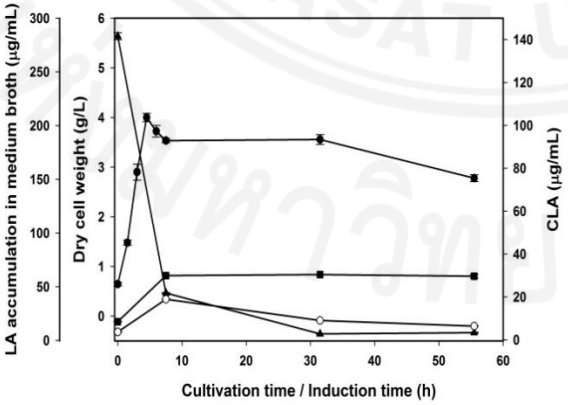
(ก) พีเอช 4.5



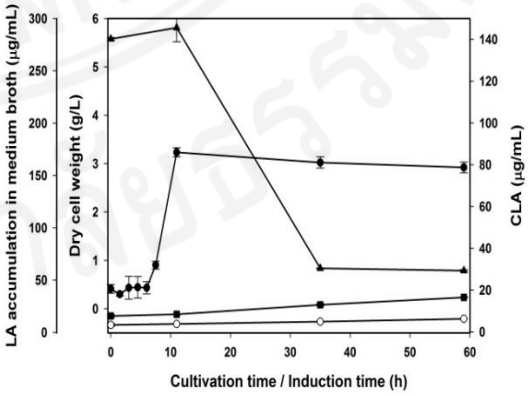
(ข) พีเอช 5.5



(ค) พีเอช 6.5

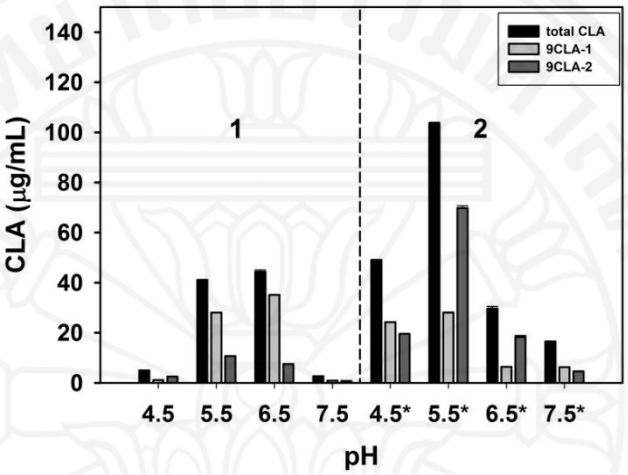


(ง) พีเอช 7.5



<u>ภาพที่ 4-36</u>

เปรียบเทียบอิทธิพลของช่วงเวลาในการเติมสับสเตรท LA และพีเอชต่อการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่มีการแปรผันพีเอชในช่วง 4.5-7.5 และช่วงเวลาในการเติมสับสเตรท กำหนดให้ 1) เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ 2) เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง



หมายเหตุ * แทนการเติมสับสเตรทตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง

จากภาพที่ 4-36 พบว่าการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.5 ของทั้งสองช่วงเวลาในการเติมสับสเตรท ให้ค่าความเข้มข้นของไอโซเมอร์ 9CLA-1 ในปริมาณที่เท่ากัน (28.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และมีระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ใกล้เคียงกัน (การเพาะเลี้ยงโดยเติมสับสเทรตตั้งแต่เริ่มกระบวนการใช้ระยะเวลาน้อยกว่าการเติมสับสเทรตเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ประมาณ 30 นาที) การเติมสับสเตรทก่อนเริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการผลิต CLA (พีเอช 5.5) ซึ่งอาจจะเป็นการช่วยเพิ่มระยะเวลาในการเปลี่ยนสับสเตรท LA ไปเป็นผลิตภัณฑ์ CLA นอกจากนี้ยังช่วยให้เซลล์สามารถปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในสภาวะที่ยับยั้งการเติบโตจากสับสเตรท LA ได้ซึ่งมีส่วนช่วยให้เซลล์สามารถผลิต CLA ได้เพิ่มขึ้น

(3) การศึกษาการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลต NB289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เมื่อไม่มีการควบคุมค่าพีเอชระหว่างการเพาะเลี้ยงและเติมกรดไขมันไลโนเลอิกความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase)

จากผลการทดลองพบว่า การเติบโตของแบคทีเรียน้อยลงเนื่องจากกรดแลคติกที่เซลล์ผลิตขึ้นในระหว่างการเติบโตส่งผลให้ค่าพีเอชของอาหารลดลงจากพีเอช 6.7 เหลือ 3.5-3.7 หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-37) ทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (0.3 ต่อชั่วโมง) และน้ำหนักเซลล์แห้ง (2.9 กรัมต่อลิตร) (ภาพที่ 4-38 และ 4-39) มีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่มีการควบคุมค่าพีเอชตลอดการเพาะเลี้ยงและเติมสับสเตรทเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่หรือข้อ (1) นอกจากนี้ปริมาณ CLA ที่ผลิตได้ยังน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงที่พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA ของไอโซเลต NB289 (พีเอช 5.5-6.5) แต่สามารถให้ผลผลิต CLA มากกว่าการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 4.5 และ 7.5 โดยให้ปริมาณ total CLA เท่ากับ 12.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการผลิต CLA สูงสุด 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.ชั่วโมง, เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีการควบคุมพีเอชและเติม LA เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ (ภาพที่ 4-40)

การเพาะเลี้ยงโดยไม่มีการควบคุมค่าพีเอชมีผลต่อการเติบโตและการผลิต CLA ทำให้เซลล์เติบโตน้อยลงหรือเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเนื่องจากค่าพีเอชที่ไม่เหมาะสม และการเติมสับสเตรท LA เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ ซึ่งเป็นช่วงที่สภาวะค่าพีเอชในระบบการเพาะเลี้ยงมีค่าพีเอชต่ำ (พีเอช 3.5-3.7) ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ LAI ในการเปลี่ยนสับสเตรท LA ไปเป็น CLA ยิ่งส่งผลให้การผลิต CLA น้อยลง แม้หลายงานวิจัยต่างยืนยันว่าการผลิต CLA ส่วนใหญ่เกิดขึ้นในช่วงหลังหรือช่วงที่เซลล์เข้าสู่ระยะคงที่แล้ว (stationary phase) (Lin และคณะ, 1999; Alonso และคณะ, 2003) แต่ถ้าช่วงเวลาดังกล่าวค่าพีเอชของน้ำหมักมีค่าเท่ากับ 3.5-3.7 ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ LAI รวมทั้งปริมาณเซลล์ที่ผลิตได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่มีการควบคุมค่าพีเอช ทำให้การผลิต CLA ลดลงตามไปด้วยเนื่องจากตัวเซลล์ของ *L. plantarum* เปรียบเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (biocatalyst) ชนิดหนึ่งในการเปลี่ยนสับสเตรท LA ไปเป็น CLA โดยมีเอนไซม์ LAI ที่เกี่ยวข้องในการผลิต CLA เป็นองค์ประกอบอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-bound enzyme) (Kim และคณะ, 2000 อ้างถึง Kepler และ Tove, 1967) ดังนั้นการผลิต CLA จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีความหนาแน่นของเซลล์สูง การควบคุมค่าพีเอชในการผลิต CLA จึงเหมาะสมต่อการผลิต CLA ได้มากกว่า (ภาพที่ 4-37)

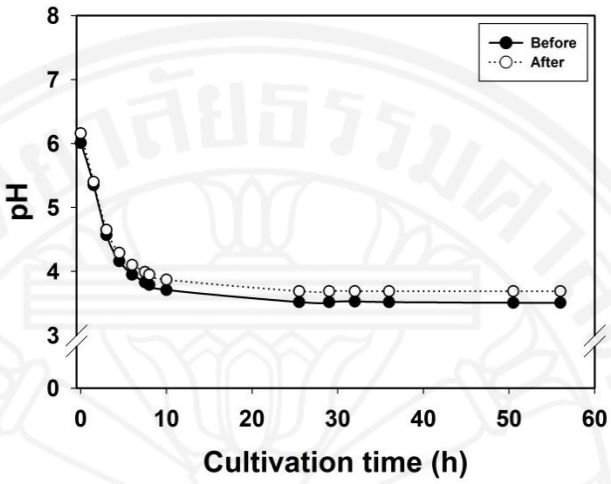
(4) การศึกษาการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลต NB289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เมื่อไม่มีการควบคุมค่าพีเอชระหว่างการเพาะเลี้ยงและเติมกรดไขมันไลโนเลอิกความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง

ผลการทดลองพบว่า อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (0.3 ต่อชั่วโมง) และน้ำหนักเซลล์แห้ง (2.6 กรัมต่อลิตร) มีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่มีการควบคุมพีเอชตลอดเวลา อย่างไรก็ตาม สามารถตรวจพบการผลิต CLA ในปริมาณที่มากกว่าการเพาะเลี้ยงที่มีการควบคุมพีเอชและเติมสับสเตรทตั้งแต่เริ่มกระบวนการ (ยกเว้นที่พีเอช 5.5) และการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการควบคุมพีเอชและเติม LA เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ โดยมีปริมาณ total CLA สูงสุดเท่ากับ 89.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-40) ให้อัตราการผลิต CLA สูงสุด 1.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.ชั่วโมง, ปริมาณไอโซเมอร์ 9CLA-1 (42.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใกล้เคียงกับ 9CLA-2 (37.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ผลได้ของ CLA จากเซลล์สูงสุด 40.9 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$, ร้อยละของ CLA สูงสุด 20.9 เปอร์เซ็นต์ในกรดไขมันทั้งหมด และอัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA เท่ากับ 47.1 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบผลการเติม LA ช่วงเวลาที่ต่างกันต่อการผลิต CLA ในสภาวะที่ไม่มีการควบคุมพีเอช พบว่าการเติม LA ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยงเหมาะสมต่อการผลิต CLA มากกว่าการเติม LA เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ แม้ว่าการไม่ควบคุมค่าพีเอชจะให้ปริมาณเซลล์น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงแบบควบคุมพีเอช แต่กลับพบผลได้ของ CLA จากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีควบคุมพีเอช (40.9 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$) มากกว่าการเพาะเลี้ยงที่มีการควบคุมพีเอชที่ 5.5 และเติม LA ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง (35.7 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$) (ตารางที่ 4-13 และ 4-14) เนื่องจากปริมาณเซลล์ที่น้อยแต่ให้ผลผลิต CLA ที่สูง รวมถึงได้ไอโซเมอร์ 9CLA-1 ที่เป็นไอโซเมอร์เป้าหมายหลักในปริมาณมาก ดังนั้นการเพาะเลี้ยงโดยไม่มีการควบคุมพีเอชในระหว่างกระบวนการผลิตจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อผลิต CLA ในระดับอุตสาหกรรมเนื่องจากให้ผลผลิต CLA ในปริมาณสูงมีขั้นตอนการเพาะเลี้ยงที่ไม่ยุ่งยากเนื่องจากไม่มีการควบคุมพีเอช

ภาพที่ 4-37

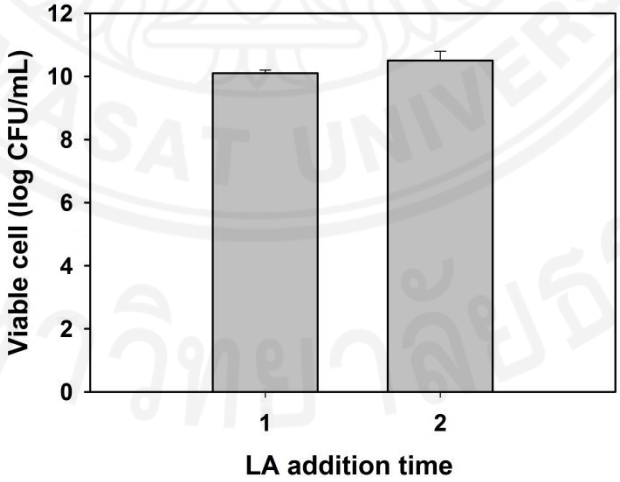
การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่ช่วงเวลาแตกต่างกันและไม่ควบคุมพีเอช



หมายเหตุ : before = เติม LA ตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมัก; after = เติม LA เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่

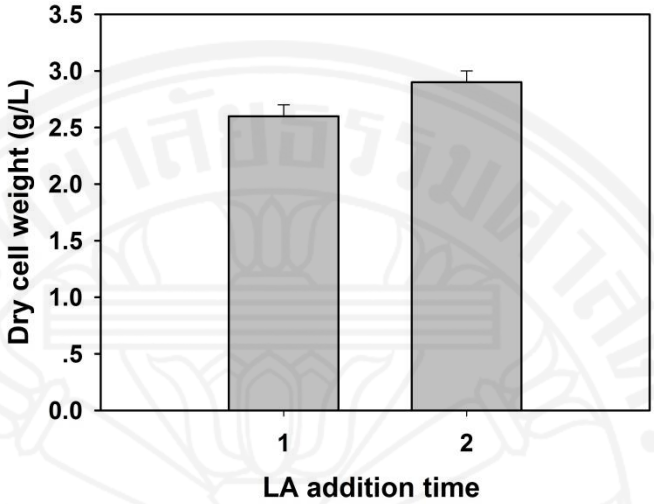
ภาพที่ 4-38

อิทธิพลของพีเอชต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. plantarum* NB289 ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ช่วงเวลาแตกต่างกันและไม่ควบคุมพีเอช



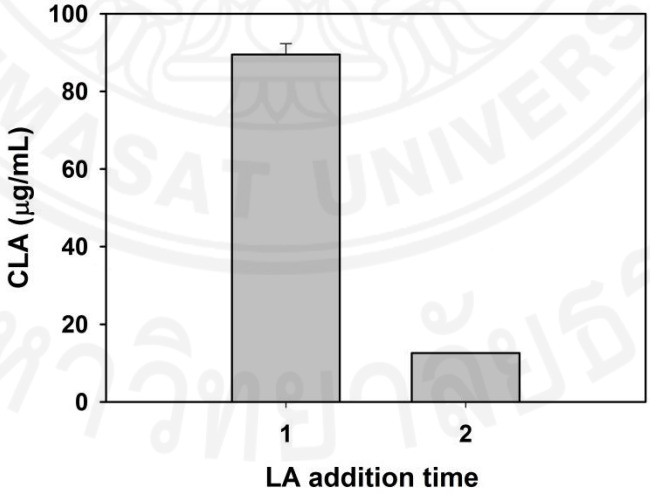
ภาพที่ 4-39

อิทธิพลของพีเอชต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *L. plantarum* NB289 ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ช่วงเวลาแตกต่างกันและไม่ควบคุมพีเอช



ภาพที่ 4-40

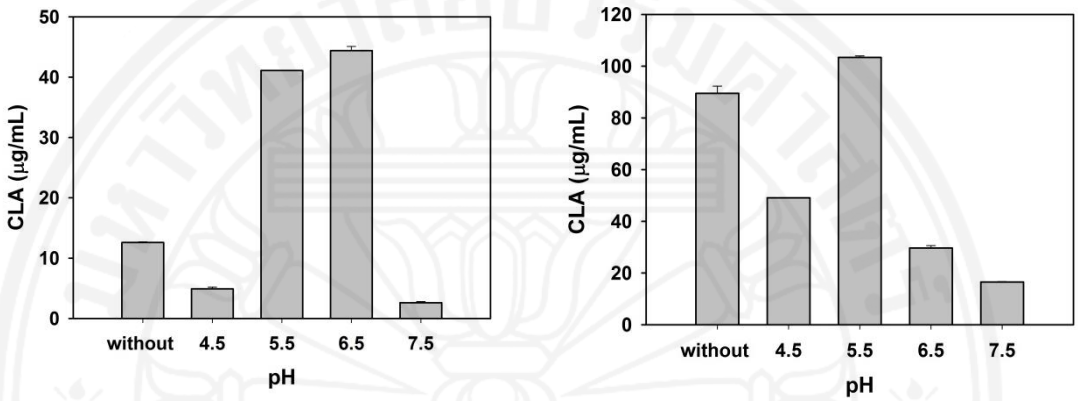
อิทธิพลของพีเอชต่อการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ช่วงเวลาแตกต่างกันและไม่ควบคุมพีเอช



ภาพที่ 4-41

เปรียบเทียบผลการผลิต CLA ที่แต่ละช่วงเวลาในการเติมสับสเตรท LA ที่มีการควบคุมพีเอชและไม่ควบคุมพีเอชของ *L. plantarum* NB289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เลี้ยงด้วยอาหาร MMRS และเติม LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์

(ก) เติม LA เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ (ข) เติม LA ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง



หมายเหตุ : without คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ควบคุมค่าพีเอช

จากผลการศึกษาการผลิต CLA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในสภาวะต่างๆ มีผลต่อการผลิต CLA โดยสามารถผลิต CLA ได้สูง 114.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากปริมาณสับสเตรท LA เท่ากับ 280 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (1.0 มิลลิโมลาร์) เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต NB05 ในสภาวะพีเอชควบคุมที่ 5.5 และเติม LA เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ รองลงมาคือ 103.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลต NB289 ในสภาวะพีเอชควบคุมที่ 5.5 และเติม LA ตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมัก เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ CLA ที่ผลิตได้และวัดระดับความสามารถหรือคุณสมบัติของเชื้อในการผลิต CLA จากแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลตที่คัดเลือกได้กับงานวิจัยอื่นๆ จึงทำการรวบรวมข้อมูลการผลิต CLA จากแบคทีเรียกรดแลคติกต่างสายพันธุ์และสภาวะการผลิตที่แตกต่างกัน (ตารางภาคผนวกที่ ง-37) จากงานวิจัยต่างๆ พบวิธีการผลิต CLA 2 แบบ คือ 1) การใช้เซลล์ชะล้างหรือเซลล์พักตัว (washed cell or resting cell) และ 2) การเพาะเลี้ยงเซลล์ (active cell cultivation) ทั้ง 2 วิธีให้ปริมาณผลผลิต CLA ที่แตกต่างกัน โดยการใช้เซลล์พักตัวทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ LA หรือสับสเตรทอื่นๆ จะให้ผลผลิต CLA ปริมาณสูงกว่ามากมาก จากการเปรียบเทียบผลการผลิต CLA ที่ทำการผลิต CLA แบบวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์พบว่า *L. plantarum* ไอโซเลต NB05 และ NB289 ก็มีการผลิตปริมาณ CLA ใกล้เคียงกับหลายงานวิจัยของ Liu และคณะ (2011) ที่คัดแยกเชื้อได้จากผักดองของประเทศจีน

ตารางที่ 4-14

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่ระยะเวลาแตกต่าง และไม่มีการควบคุมพีเอช

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	ช่วงเวลาในการเติม LA	
	เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่	ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	2.9 ± 0.1	2.6 ± 0.1
จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ล็อค โคโลนีต่อมิลลิลิตร)	10.5 ± 0.3	10.1 ± 0.1
อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.3± 0.0	0.3 ± 0.0
กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	12.6 ± 0.1	89.5 ± 2.8
ไอโซเมอร์ 9CLA-1 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	4.9 ± 0.1	42.9 ± 1.1
ไอโซเมอร์ 9CLA-2 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	3.8 ± 0.1	37.3 ± 0.7
ไอโซเมอร์ 10CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	3.7 ± 0.2	5.6 ± 0.7
ผลได้ของ CLA จากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	5.5 ± 0.3	40.9 ± 3.9
กรดไขมันทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	500.5 ± 7.2	427.8 ± 0.1
ผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดจากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	217.6 ± 2.6	195.4 ± 6.5
ร้อยละของ CLA (% ของกรดไขมันทั้งหมด)	2.5 ± 0.0	20.9 ± 2.1
อัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA (%)	7.3 ± 0.0	47.1 ± 0.7
อัตราการผลิต CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.ชั่วโมง)	0.2	1.6
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	56.2	56.2
ระยะการเจริญก่อนการเหนี่ยวนำ (ชั่วโมง)	8.2	8.2

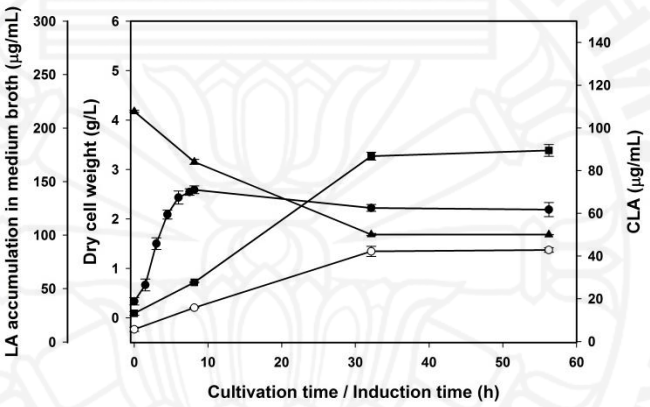
หมายเหตุ : พีเอชเริ่มต้นของอาหารอยู่ที่ 6.5

<u>ภาพที่ 4-42</u>

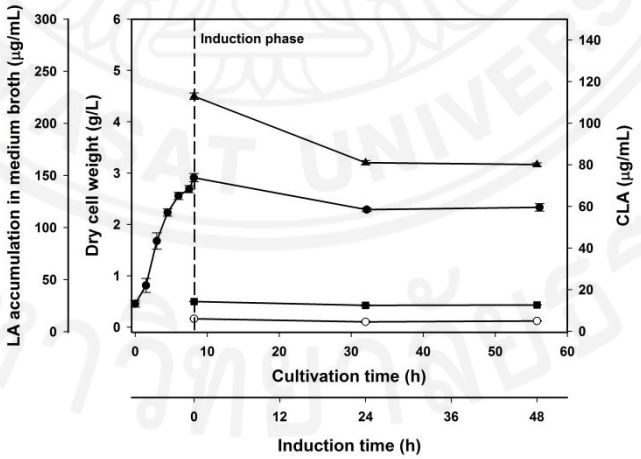
รูปแบบการเจริญและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยอาหาร MMRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยไม่ควบคุมค่าพีเอช และแปรผันช่วงเวลาในการเติมสับสเตรท LA 1.0 มิลลิโมลาร์

(สัญลักษณ์● แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง ; สัญลักษณ์ ▲ แทนกรดไขมันไลโนเลอิก ; สัญลักษณ์ ■ แทน totalCLA ; สัญลักษณ์ ○แทน 9CLA-1 ; สัญลักษณ์ --- (เส้นประ) แทนช่วงเวลาในการเติม LA)

(ก) เติมสับสเตรท LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมัก



(ข) เติมสับสเตรท LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่



บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่มีความสามารถในการผลิต CLA ได้สูง จากแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักของไทยประเภทเนื้อสัตว์และผักทั้งหมด 44 ไอโซเลต ด้วยอาหาร MMRS และ MMRS ที่เติมสับสเตรท LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบเชื้อจำนวน 4 ไอโซเลต ที่สามารถผลิต CLA ได้ คือ *L. plantarum* NB05 (คัดแยกได้จากไส้กรอกอีสานเนื้อ), NB289, NB311 และ NB324 (คัดแยกได้จากไส้กรอกอีสานหมู) ซึ่งทุกไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิต CLA แยกได้จากอาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์ ดังนั้น แหล่งของเชื้อจึงมีผลต่อการแยกให้ได้เชื้อที่มีความสามารถในการผลิต CLA โดยจากเชื้อที่มีความสามารถในการผลิต CLA ทั้ง 4 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลต NB05 และ NB289 มีความสามารถในการผลิต CLA ได้สูงสุด จากนั้นจึงทำการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA โดยศึกษาความเข้มข้นของ LA ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA ความสามารถในการใช้สับสเตรทชนิดอื่น (อิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลือง) ต่อการผลิต CLA และการทดสอบการผลิต CLA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในแต่ละปัจจัยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับไอโซเลตของแบคทีเรีย

จากการศึกษาในเชื้อ NB05 พบปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการผลิต CLA คือ ความเข้มข้นของ LA ค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่าค่าความเข้มข้นของ LA ที่ 2.0 มิลลิโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่พีเอช 7.5 ให้ CLA ได้สูงสุด การผลิต CLA ในอาหารที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารด้วยระบบโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7.5 ให้ปริมาณ CLA ทั้งหมด สูงสุด และมีแนวโน้มการผลิต CLA ได้มากขึ้นถ้าพีเอชเริ่มต้นของอาหารมากกว่าพีเอช 7.5 เมื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการใช้อิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองในการผลิต CLA พบว่าไม่สามารถผลิต CLA ได้ เนื่องจากความเข้มข้นของอิมัลชั่นน้ำมันถั่วเหลืองมีปริมาณ LA ที่สูงมาก และโครงสร้างของน้ำมันถั่วเหลืองยังอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกไม่สามารถนำไปใช้ในการผลิต CLA ได้ทำให้ไม่พบการผลิต CLA จากนั้นทำการศึกษาการผลิต CLA ด้วยกระบวนการหมักแบบแบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ที่มีการควบคุมพีเอชที่ 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 (ด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2 โมลาร์ และ H_3PO_4 ความเข้มข้น 2 โมลาร์) และเติม LA เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่

(ทำการศึกษาพร้อมกับไอโซเลต NB289, NB324 และ NB311) พบว่าการควบคุมพีเอชที่ 5.5 ให้ผลผลิต CLA ได้สูงที่สุด มีปริมาณ CLA ทั้งหมด เท่ากับ 114.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการผลิต CLA สูงสุด เท่ากับ 2.045 มิลลิกรัมต่อลิตร.ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่เติมสับสเตรท LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 56 ชั่วโมง จากผลการทดลองนี้ยืนยันว่า NB05 เป็นไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการผลิต CLA ได้สูงสุดจากทั้งหมด 4 ไอโซเลต โดยให้ผลผลิต CLA คงที่และมีปริมาณสูง

ไอโซเลต NB289 พบปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการผลิต CLA คือ ความเข้มข้นของ LA ค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่าค่าความเข้มข้นของ LA ที่ 1.0 มิลลิโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่พีเอช 7.5 ให้ CLA ได้สูงสุดเช่นเดียวกับไอโซเลต NB05 และไม่สามารถใช้อิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองเป็นสับสเตรทในการผลิต CLA ได้เช่นกัน จากนั้นทำการศึกษาการผลิต CLA ด้วยกระบวนการหมักแบบแบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ไอโซเลต NB289 มีการศึกษาแตกต่างจาก NB05 เนื่องจากความเข้มข้นของ LA ที่ใช้ศึกษาในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นค่าความเข้มข้นของ LA ที่เหมาะสมต่อไอโซเลต NB289 และเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการใช้ NB289 เป็นไอโซเลตทางเลือกในการผลิต CLA ต่อไป โดยแปรผันค่าพีเอชควบคุมในแต่ละชุดการทดลอง (ด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2 โมลาร์ และ H_3PO_4 ความเข้มข้น 2 โมลาร์) 2 แบบ คือ ควบคุมพีเอชที่ 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 และไม่ควบคุมพีเอช และช่วงเวลาในการเติมสับสเตรท 2 แบบ คือ เติม LA เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ และเติม LA ตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการเพาะเลี้ยง พบว่าการควบคุมพีเอชที่ 5.5 และเติม LA ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยงให้ผลผลิต CLA ได้เพิ่มขึ้นสูงสุด เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ทำการศึกษาพร้อมกับไอโซเลต NB05 (ควบคุมพีเอชและเติม LA เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่) มีปริมาณ CLA ทั้งหมด เท่ากับ 103.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการผลิต CLA เท่ากับ 1.863 มิลลิกรัมต่อลิตร.ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่เติมสับสเตรท LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ เป็นเวลา 55.5 ชั่วโมง

ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต CLA ของไอโซเลต NB05 ในหลอดทดลอง คือ การเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่เติม LA ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ โดยอาหาร MMRS ที่ใช้ควรมีการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารด้วยระบบบัฟเฟอร์ที่ค่าพีเอช 7.5 หรือมากกว่า เนื่องจากระบบบัฟเฟอร์ช่วยให้ค่าพีเอชของอาหารลดช้าลง ซึ่งส่งผลต่อสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ LAI (ช่วงพีเอช 5.0-6.0) มากขึ้นจึงทำให้สามารถผลิต CLA ได้เพิ่มมากขึ้น และเพาะเลี้ยงในสภาวะมีออกซิเจนจำกัดหรือออกซิเจนเล็กน้อย ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง ส่วนสภาวะ

ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ คือ การเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่มีการควบคุมค่าพีเอชตลอดเวลาที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 การควบคุมค่าพีเอชช่วยให้เซลล์มีการเติบโตได้เพิ่มขึ้นเนื่องจากค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ในช่วงพีเอช 5.5-6.5 และเติมสับสเตรท LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ในช่วงที่เซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีความหนาแน่นสูง พบว่าเซลล์สามารถเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA ได้อย่างรวดเร็ว โดยมีผลได้ของ CLA จากเซลล์สูงสุด 42.1 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{\text{เซลล์}}$ อัตราการผลิต CLA ที่ 2.045 มิลลิกรัมต่อลิตร.ชั่วโมง ซึ่งเป็นอัตราการผลิต CLA ที่สูงที่สุดใน 4 ไอโซเลต อัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA สูงสุด 69.4 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตไอโซเมอร์ 9CLA-1 เป็นไอโซเมอร์หลัก (68 เปอร์เซ็นต์) และ 9CLA-2, 10CLA เป็นไอโซเมอร์รอง (28 และ 1.6 เปอร์เซ็นต์) และการเติม LA ในช่วงที่เซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ยังช่วยลดหรือหลีกเลี่ยงผลการยับยั้งการเติบโตของเซลล์เนื่องจากความเป็นพิษของ LA ได้อีกด้วย

ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต CLA ของไอโซเลต NB289 ในหลอดทดลอง คือ การเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่เติม LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ โดยอาหาร MMRS มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ค่าพีเอช 7.5 หรือมากกว่า (เช่นเดียวกับไอโซเลต NB05) และเพาะเลี้ยงในสภาวะมีออกซิเจนจำกัดหรือออกซิเจนเล็กน้อย ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง ส่วนสภาวะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ คือ การเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่มีการควบคุมค่าพีเอชตลอดเวลาด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และสารละลายกรดฟอสฟอริกที่พีเอช 5.5 และเติมสับสเตรท LA ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง การเติม LA ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยงจะส่งผลต่อการเติบโตของเซลล์และปริมาณเซลล์ที่น้อยกว่าการเติมเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ แต่การเติมตั้งแต่เริ่มกระบวนการมีระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาในการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA ที่นานกว่าการเติม LA ทเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ จึงส่งผลให้ไอโซเลต NB289 สามารถผลิต CLA ได้เพิ่มมากขึ้น (ถ้าทำการทดสอบชุดการทดลองนี้กับไอโซเลต NB05 คาดว่าจะให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ CLA ได้เพิ่มมากขึ้น) โดยมีผลได้ของ CLA จากเซลล์สูงสุด 35.7 มิลลิกรัมต่อกรัม$_{\text{เซลล์}}$ และอัตราการผลิต CLA ที่ 1.863 มิลลิกรัมต่อลิตร.ชั่วโมง ซึ่งเป็นอัตราการผลิต CLA ที่สูงที่สุดใน 4 ชุดการทดลองของ NB289 และอัตราการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA สูงถึง 94.1 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม CLA ที่ผลิตได้จากชุดการทดลองนี้มีปริมาณไอโซเมอร์ 9CLA-2 (68 เปอร์เซ็นต์) มากกว่า 9CLA-1 (27 เปอร์เซ็นต์) เนื่องจากระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่นานกว่าอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนไอโซเมอร์จาก 9CLA-1 ไปเป็น 9CLA-2 ได้มากขึ้น

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิต CLA ได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลต พบ 2 ไอโซเลต คือ *L. plantarum* NB05 และ NB289 มีความสามารถในการผลิต CLA ได้สูง ทั้งสองไอโซเลตมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA ที่แตกต่างกัน โดยความเข้มข้นของสับสเตรท LA ที่เหมาะสมสำหรับไอโซเลต NB05 มีค่าเท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์ ส่วนไอโซเลต NB289 มีค่าเท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์ โดยแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB05 มีความสามารถในการผลิต CLA ได้สูงกว่าไอโซเลต NB289 ค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารที่เหมาะสมมีค่าในช่วงพีเอช 7.5 หรือมากกว่าจะช่วยส่งเสริมผลการผลิต CLA ให้เพิ่มขึ้นและยังส่งผลต่อปริมาณการผลิตไอโซเมอร์ของ CLA อีกด้วย และการศึกษาการเติบโตและการผลิต CLA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 4 ชุดการทดลอง พบว่าไอโซเลต NB05 สามารถผลิต CLA ได้สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะควบคุมพีเอชที่ 5.5 และเติม LA เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ อีกทั้งยังสามารถเพิ่มปริมาณการผลิต CLA จากไอโซเลต NB289 ได้มากขึ้นเมื่อเปลี่ยนสภาวะการเพาะเลี้ยงเป็นสภาวะควบคุมพีเอชและเติม LA ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง และสภาวะไม่ควบคุมพีเอชและเติม LA ตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษานี้ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิต CLA เพื่อดูแนวโน้มการผลิต CLA ว่าจะสามารถเพิ่มขึ้นตามค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารตามที่ตั้งสมมติฐานหรือไม่ โดยทำการศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารด้วยระบบฟอสเฟตซิเตรทบัฟเฟอร์ที่ค่าพีเอชมากกว่า 7.5 ขึ้นไป รวมถึงการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการควบคุมสภาวะพีเอชด้วยระบบบัฟเฟอร์แทนการใช้กรด-ด่าง เพื่อนำผลที่ได้จากทั้งสองส่วนมาเปรียบเทียบกัน นอกจากนี้ทำการศึกษาการผลิต CLA โดยใช้ไอโซเลต NB05 ที่มีความสามารถในการผลิต CLA ได้คงที่และมีปริมาณการผลิตที่สูง มาทำการผลิต CLA ในรูปแบบอื่นๆ เช่น การใช้เซลล์ที่ผ่านการล้างหรือเซลล์พักตัว (washed cell หรือ resting cell) ในการทำปฏิกิริยาการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA เพื่อเพิ่มผลผลิต CLA ที่มากกว่าการทำปฏิกริยาในรูปแบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ (active-cell cultivation) รวมทั้งทำการศึกษาในการหมักแบบอื่นๆ เช่น การหมักแบบอาหารแข็งเพื่อผลิตเป็นอาหารสัตว์ เป็นต้น และทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สับสเตรทอื่นๆ ในการผลิต CLA เพื่อลดต้นทุนค่าใช้จ่ายในการผลิต CLA ระดับอุตสาหกรรม โดยนำอิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลืองไปผ่านกระบวนการไฮโดรไลซ์ให้อยู่ในรูปกรดไขมันไลโนเลอิกอิสระที่เซลล์สามารถนำไปใช้ได้ก่หรือทดสอบสับสเตรทชนิดอื่นๆ ที่เคยมีรายงานว่าสามารถใช้เป็นสับสเตรทในการผลิต CLA ได้ และศึกษาการปรับลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงในกระบวนการหมักแบบแบทช์ให้สั้นลง เนื่องจากพบการผลิต CLA ได้สูงตั้งแต่เวลา 36 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ซึ่งการเก็บตัวอย่างที่ทิ้งช่วงห่างกันเกินไป (ทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมงหลังจากเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่) อาจทำให้

พลาดจุดสูงสุดของการผลิต CLA รวมทั้งการลดระยะเวลาในกระบวนการผลิตก็ถือเป็นการลดต้นทุนในการผลิตได้เช่นกัน ซึ่งผลการทดลองต่างๆ ที่ได้จากการศึกษานี้และแนวทางในการศึกษาต่อในอนาคตจะสามารถใช้เป็นองค์ความรู้และในการพัฒนาการผลิต CLA ในระดับอุตสาหกรรม ทางด้านอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์ เพื่อเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์อาหารหรือเพิ่มคุณภาพทางโภชนาการของอาหารสัตว์จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

รายการอ้างอิง

1. โฆษิต เสือใจ (2555) การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* ที่ผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจากการหมักของไทย. โครงการปัญหาพิเศษสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. ปทุมธานี

2. บุษกร อุตรภิชาติ (2547) จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภารกิจเอกสารและตำรา มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา.

3. บุษกร อุตรภิชาติ (2548) มารู้จัก“แบคทีเรียกรดแลคติก”กันเถอะ. บทความวิชาการ. ปีที่ 2 ฉบับที่ 2 วารสารวิทยาศาสตร์ทักษิณ มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา.

4. อ้อยนภา แซ่ลิ้ม (2552) การพัฒนาระบบการผลิต Conjugated linoleic acid (CLA) ต้นแบบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก. วิทยานิพนธ์สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา

5. AbuGhazaleh, A.A. and Jacobson, B.N. (2007) The effect of pH and polyunsaturated C18 fatty acid source on the production of vaccenic acid and conjugated linoleic acids in ruminal cultures incubated with docosahexaenoic acid. Anim. Feed Sci. Tech. 136: 11-22.

6. Al-Mandaney, M.M., Kramer, J.K., Deng, Z. and Vanderhoek, J.Y. (2003) Effects of lipid-esterified conjugated linoleic acid isomers on platelet function: evidence for stimulation of platelet phospholipase activity. Biochim. Biophys. Acta. 1635: 75-82.

7. Alonso, L., Cuesta, E.P. and Gilliland, S.E. (2003) Production of free linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. J. Dairy Sci. 86: 194-1946.

8. Ando, A., Ogawa, J., Kishino, S., and Shimizu, S. (2003) Conjugated linoleic acid production from ricinoleic acid by lactic acid bacteria. J. Am. Oil. Chem. Soc. 80: 889-894.

9. Ando, A., Shimizu, S., Kishino, S., and Ogawa, J. (2004) Conjugated linoleic acid production from castor oil by *Lactobacillus plantarum* JCM 1551. Enzyme Microb. Technol. 35: 40-45.

10. Belury, M.A. (2002) Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. Annu. Rev. Nutr. 22: 505-531.

11. Bessa, R.J.B., Santos-Silva, J., Ribeiro, J.M.R. and Portugal, A.V. (2000) Recticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. Livest. Prod. Sci. 63: 201-211.

12. Boyaval, P., Corre, C., Dupuis, C. and Roussel, E. (1995) Effects of free acids on propionic acid bacteria. Lait. 75: 17-29.

13. Chen, H., Yang, B., Gu, S., Zhang, B., Xu, Q., Ye, Q., Song, Y., Chen, Y.Q., Zhang, H. and Chen, W. (2012) Purification and characterization of linoleate isomerase from *Lactobacillus plantarum* ZS2058. Afr. J. Biotechnol. 11 (20): 4579-4587.

14. Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L. and Pariza, M.W. (1992) Dietary sources of conjugated linoleic acid, a newly recognized class of a anticarcinogens. J. Food Comp. Anal. 5: 185-197.

15. Choi, N.J., Imm, J.Y., Oh S., Kim, B.C., Hwang, H.J. and Kim, Y.J. (2005) Effect of pH and oxygen on conjugated linoleic acid (CLA) production by mixed rumen bacteria from cows fed high concentrate and high forage diets. Anim. Feed Sci. Tech. 123-124: 643-653.

16. Christie, W.W., Dobson, G. and Gunstone, F.D. (1997) Isomers in commercial samples of conjugated linoleic acid. Lipids. 32: 1231.

17. Chung, S.H., Kim, I.H., Park, H.G., Kang, H.S., Yoon, C.S., Jeong, H.Y., Choi, N.J., Kwon, E.G. and Kim, Y.J. (2008) Synthesis of conjugated linoleic acid by human-derived Bifidobacterium breve LMC 017: utilization as a functional starter culture for milk fermentation. J. Agric. Food Chem. 56: 3311-3316.

18. Coakley, M., Ross, R. P., Nordgren, M., Fitzgerald, G., Devery, R. and Stanton, C. (2003) Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived Bifidobacterium species. J. Appl. Microbiol. 91(1): 138-145.

19. Corl, B.A., Baumgard, L.H., Dwyer, D.A., Griinari, J.M., Phillips, B.S. and Bauman, D.E. (2001) The role of delta(9)-desaturase in the production of *cis-9*, *trans-11* CLA. J. Nutr. Biochem. 12: 622-630.

20. Dannenberger, D., Nuernberg, K., Nuernberg, G., Scollan, N., Steinhart, H. and Ender, K. (2005) Effect of pasture vs. concentrate diet on CLA distribution in different tissue lipids of beef cattle. Lipids. 40: 589-598.

21. Dawson, R.M.C. and Kemp, P. (1970) Biohydrogenation of dietary fats in ruminants. In: Phillipson (ed.). Physiology of Digestion and Metabolism in the ruminants. Oriel Press. 504-518. Newcastle-upon-tyne, UK.

22. De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Bacteriol. 23:130.

23. Desbois, A.P. and Smith, V.J. (2010) Antibacterial free fatty acids: Activities, Mechanisms of action and biotechnological potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85(6): 1629-1642.

24. Dhiman, T.R., Nam, S.H. and Ure, A.L. (2005) Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. Crit. Rev. Food Sci. 45: 463-482.

25. Dong, M. and Qi, S. (2006) Conjugated linoleic acid production by fermentation. Int. J. Food Eng. 2: article 3.

26. Dunford, N.T. (2001) Heath benefits and processing of lipid-based nutritionals. Food Tech. 55: 38-44.

27. Fuentes, M.C., Calsamiglia, S., Cardozo, P.W. and Vlaeminck, B. (2009) Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. J. Dairy Sci. 92: 4456-4466.

28. Fu, W. and Mathews, A.P. (1999) Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. Biochem. Eng. J. 3: 163-170.

29. Gorissen, L., Weckx, S., Vlaeminck, B., Reas, K., Vuyst, D., Smet, D. and Leroy, F. (2011) Linoleate isomerase activity occurs in lactic acid bacteria strains and is affected by pH and temoerature. J. Appl. Microbiol. 111: 593-606.

30. Hayek, M.G., Han, S.N., Wu, D., Watkins, B.A., Meydani, M. and Dorsey, J.L. (1999) Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrlBR mice. J. Nutr. 129(1): 32-38.

31. Henderson, C. (1973) The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. J. Agric. Sci. 81: 107-112.

32. Houseknecht, K.L., VandenHeuvel, J.P., Moya-Camarena, S.Y., Portocarrero, C.P., Peck, L.W. and Nickel, K.P. (1998) Dietary conjugated linoleic acid normalizes

impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. Biochem. Bioph. Res. Co. 244 (3): 678-682.

33. Huang, Y.C., Luedecke, L.O. and Shultz, T.D. (1994) Effect of cheddar cheese consumption on plasma conjugated linoleic acid in men. Nutr. Res. 14(3): 373-386.

34. Ip, C., Chin, S.F., Scimeca, J.A. and Pariza, M.W. (1991) Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. Cancer. Res. 51: 6118-6124.

35. Jenkins , J.K. and Courtney, P.D. (2003) *Lactobacillus* growth and mem brane composition in the presence of linoleic or conjugated linoleic acid. Can. J. Microbiol. 49(1): 51-57.

36. Jiang, J., Bjorck, L., and Fonden, R. (1998) Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. J. Appl. Microbiol. 85: 95-102.

37. Kankaanpää, P., Yang, B., Kallio, H., Isolauri, E. and Salminen, S. (2004) Effect of polyunsaturated fatty acids in growth medium on lipid composition and on physicochemical surface properties of *lactobacilli*. Appl. Environ. Microbiol. 70(1): 129-136.

38. Kepler, C.R., Hirons, K.P., McNeill, J.J. and Tove, S.B. (1966) Intermediates and products of biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolven*. J. Biol. Chem. 241: 1350-1354.

39. Kepler, C.R. and Tove, S.B. (1967) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III. Purification and properties of a linoleate 12-*cis*, 11-*trans*-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolven*. J. Biol. Chem. 242(24) : 5686-5692.

40. Kepler, C.R. and Tove, S.B. (1969) Linoleate *cis*-9,*trans*-11 isomerase, in methods in enzymology edited by Lowenstein. Academic Press. 14: 105-110. New York. 242: 5686-5692.

41. Kepler, C.R. and Tove, S.B. (1970) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. J. Biol. Chem. 245: 3612-3620.

42. Kim, Y.J., Liu, R.H., Bond, D.R. and Russell, J.B. (2000) Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. Appl. Environ. Microbiol. 66(12): 5226-5230.

43. Kim, Y.J., Liu, R.H., Rychlik, J.L. and Russell, J. B. (2002) The enrichment of ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. J. Appl. Microbiol. 92: 976-982.

44. Kishino, S., Ogawa, J., Ando, A., Omura, Y. and Shimizu, S. (2002) Ricinoleic acid and castor oil as substrates for conjugated linoleic acid production by washed cells of *Lactobacillus plantarum*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 2283-2286.

45. Kritchevsky, D., Tepper, S.A., Wright, S. and Czarnecki, S.K. (2002) Influence of graded levels of conjugated linoleic acid (CLA) on experimental atherosclerosis in rabbits. Nutr. Res. 22: 1275-1279.

46. Lai, C., Yin, J., Li, D., Zhao, L. and Chen, X. (2005) Effects of dietary conjugated linoleic acid suppleamentation on performance and immune function of weaned pigs. Arch. Anim. Nutr. 59: 41-51.

47. LeBlanc, J.G., Garro, M.S. and Savoy, de. Giori. G. (2004) Effect of pH on Lactobacillus fermentum growth, raffinose removal, galactosidase activity and fermentation product. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65: 265-271.

48. Li, G., Barnes, D., Butz, D., Bjorling, D. and Cook, M.E. (2005) 10*t*, 12*c*-conjugated linoleic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase expression in vitro and in vivo. J. Lipid Res. 46: 2134-2142.

49. Li, J., Zhang, L., Han, X., Yi, H., Guo, C., Zhang, Y., Du, M., Luo, X., Zhang, Y. and Shan, Y. (2013) Effect of incubation conditions and possible intestinal nutrients on *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid production by *Lactobacillus acidophilus* F0221. Int. Dairy J. 29: 93-98.

50. Lichtenstein, A.H., Ausman, L.M., Jalbert, S.M and Schaefer, E.J. (1999) Effects of different forms of dietary hydrogenated fats on serum lipoprotein cholesterol levels. N. Engl. J. Med. 340: 1933-1940.

51. Lin, T.Y., Lin C.W. and Lee, C.H. (1999) Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. Food Chem. 67: 1-5.

52. Lin, T.Y., Lin, C.W. and Wang, Y.J. (2002) Linoleic acid isomerase activity in enzyme extracts from *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. J. Food Sci. 67: 1502-1505.

53. Lin, T.Y., Hung, T.H. and Cheng T.S.J. (2005) Conjugated linoleic acid production by immobilized cells of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*. Food Chem. 92: 23-28.

54. Liu, P., Shen, S.R., Ruan, H., Zhou, Q., Ma, L.L. and He, G.Q. (2011) Production of conjugated linoleic acids by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented Chinese pickles. *J. Zhejiang Univ. SCI. B. (Biomedicine & Biotechnology)*. 12(11): 923-930.

55. Maczulak, A.E., Dehority, B.A. and Palmquist, D.L. (1981) Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 42: 856-862.

56. Matagaras, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M. and Drosinos, EH. (2003). Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. Meat Sci. 64: 265-271.

57. Mulvihill, B. (2001) Ruminant meat as a source of conjugated linoleic acid (CLA). Nutr Bull. 26: 295-299.

58. Ogawa, J., Matsumura, K., Kishino, S., Omura, Y. and Shimizu. S. (2001) Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12-octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1246-1252.

59. Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K. and Shimizu, S. (2005) Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. J. Biosci. Bioeng. 100(4): 355-364.

60. Oh, D.K., Hong, G.H., Lee, Y., Min, S.G., Sin, H.S. and Cho, S.K. (2003) Production of conjugated linoleic acid by isolated Bifidobacterium strains. World J. Microb. Biot. 19: 907-912.

61. Park, Y., Albright, K.J., Liu, W., Storkson, J.M., Cook, M.E. and Pariza. M.W. (1997) Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. Lipids. 32: 853-858.

62. Park, Y. and Pariza, M.W. (2007) Mechanism of body fat modulation by conjugated linoleic acid. Food Res. Int. 40: 311-323.

63. Park, Y. (2009) Conjugated linoleic acid (CLA): Good or bad *trans* fat?. J. Food Comp. Anal. 22S: S4-S12.

64. Pariza, M.W. and Yang, X.Y. (1999) Method for producing conjugated fatty acids. U S Patent no. 5,856149.

65. Partanen, L., Marttinen, N. and Alatossava, T. (2001) Fats and fatty acids as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii*. Syst. Appl. Microbiol. 24(4): 500-506.

66. Peng, S.S., Deng, M.D., Grund, A.D. and Rosson, R.A. (2007) Purification and characterization of a membrane-bound linoleic acid isomerase from *Clostridium sporogenes*. Enzyme Microb. Tech. 40: 831-839.

67. Polan, C.E., McNeill, J.J. and Tove, S.B. (1964) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. J. Bacteriol. 88: 1056-1064.

68. Poth, U. (2001) Drying oils and related products. Ullmann's encyclopedia of iIndustrial chemistry Wiley-VCH. Weinheim. Germany.

69. Rainio, A., Vahvaselkä, M., Suomalainen, T. and Laakso, S. (2001) Reduction of linoleic acid inhibition in production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. Can. J. Microbiol. 47: 735-740.

70. Rainio, A., Vahvaselkä, M., Suomalainen, T. and Laakso, S. (2002) Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *INRA, EDP.* Science. 82: 91-101.

71. Rodríguez-Alcalá, L.M., Braga, T., Xavier Malcata, F., Gomes, A. and Fontecha, J. (2011) Quantitative and qualitative determination of CLA produced by Bifidobacterium and lactic acid bacteria by combining spectrophotometric and Ag +-HPLC techniques. Food Chem. 125(4): 1373-1378.

72. Romero-Pérez, G.A., Inoue, R., Ushida, K. and Yajima, T. (2013) A rapid method of screening lactic acid bacterial strains for conjugated linoleic acid production. Biosci. Biotechnol. Biochem. 77(3) : 648-650.

73. Schmid, A., Collomb, M., Sieber, R. and Bee, G. (2006) Conjugated linoleic acid in meat and meat products: a review. Meat Sci. 73: 29-41.

74. Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P. and Eyer, H. (2004) Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products - a review. Int. Dairy J. 14: 1-15.

75. Soto, C. (2013) *Lactobacillus plantarum* as source of conjugated linoleic acid: Effect of pH, incubation temperature and inulin incorporation. J. Biochem. Tech. 5(1): 649-653

76. Song, Y.S., Kang, S.W., Oh, D.K., Rho, Y.T., Hong, S.I. and Kim, S.W. (2005) Bioconversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by *Bifidobacterium breve*. Biotechnol. Bioprocess Eng. 10: 357-361.

77. Troegeler-Meynadier, A., Nicot, M. C., Bayourthe, C., Moncoulon, R. and Enjalbert, F. (2003) Effect of pH and concentrations of linoleic and linolenic acids on extent and intermediated of ruminal biohydrogenation in vitro. J. Dairy Sci. 86: 4054-4063.

78. Van Nieuwenhove, C.P., Oliszewski, R., Gonzalez, S.N. and Perez Chaia, A.B., (2007) Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk. Lett. Appl. Microbiol. 44(5): 467-474.

79. Van Nieuwenhove, C.P., Terán, V. and González, S.N. (2012) Chapter 3 - Conjugated linoleic and linolenic acid production by bacteria: Development of functional foods. Intech. 55-80.

80. Wang, L.M., Lv, J.P., Chu, Z.Q., Cui, Y.Y. and Ren, X.H. (2007) Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii*. Food Chem. 103: 313-318.

81. Willett, W.C. Stampfer, M.J. Manson, J.E. Colditz, G.A. Speizer, F.F., Rosner, B.A., Sampson, L.A. and Hennekens, C.H. (1993) Intake of *trans* fatty acids and risk of coronary heart disease among women. Lancet. 341: 581-585.

82. Wood, B.J. and Holzapfel. W.H. (1995) The Genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman & Hall. London , Melbourne.

83. Xu, S., Boylston, T. and Glatz, B. (2004) Effect of lipid source on probiotic bacteria and conjugated linoleic acid formation in milk model systems. J. Am. Oil. Chem. Soc. 81: 589-595.

84. Xu, H., Lee, H.Y., Hwang, B., Nam, J.H., Kang, H.Y. and Ahn, J. (2008) Kinetics of microbial hydrogenation of free linoleic acid to conjugated linoleic acids. J. Appl. Microbiol. 105(6): 2239-2247.

85. Yurawecz, M., Mossoba, M., Kramer, J., Pariza, M. and Nelson, G. (1999) Advances in conjugated linoleic acid research. AOCS Press, Champaign, Illinois, USA.

86. Zhang, Y.A., Shan, A.S. Jiang, W., Bi, C.P. and Li, Z.Y. (2013) The effect of vitamin E on growth performance and meat quality in broilers given diets containing distillers dried grains with solubles (DDGS). Br. Poult. Sci. 54: 138-143.

87. Zhao, H.W., Lv, J.P. and Li, S.R. (2011) Production of conjugated linoleic acid by whole-cell of Lactobacillus plantarum A6-1F. Biotechnol. Biotechnol. Eq. 25(1): 2266-2272.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และวิธีการเตรียม

1. การเตรียมสารละลาย 0.5 โมลาร์ ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช ค่าพีเอชเท่ากับ 3.5, 4.5 และ 5.5

สารละลาย A : 0.5 M กรดซิตริก ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (ชั่งกรดซิตริก 105.07 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.5 M Na_2HPO_4 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (ชั่ง Na_2HPO_4 134.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

ผสมสารละลาย A และ B และปรับค่าพีเอชเท่ากับ 3.5, 4.5 และ 5.5 ด้วยคู่กรดเบสของบัฟเฟอร์ จากนั้นนำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2. การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 และ 7.5

สารละลาย A : 0.5 M K_2HPO_4 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (ชั่ง K_2HPO_4 87.09 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.5 M KH_2PO_4 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (ชั่ง KH_2PO_4 68.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

* โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร
ผสมสารละลาย A ปริมาตร 60 มิลลิลิตร กับ สารละลาย B ปริมาตร 140 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

** โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ปริมาณ 200 มิลลิลิตร
ผสมสารละลาย A ปริมาตร 185 มิลลิลิตร กับ สารละลาย B ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. การเตรียมสารละลายกรดไขมันเพนตะเดคะไดอีโนอิกในไอโซโพรพานอล (C15:0 in iso-propanal)

เตรียมสารละลายกรดไขมันเพนตะเดคะไดอีโนอิกความเข้มข้น 0.2012 กรัม โดยชั่ง pentadecadienoic acid 0.1000 กรัม นำมาละลายด้วย iso-propanal และปรับปริมาตรเท่ากับ 500 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในเมทานอล ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (5%(v/v) HCl in MeoH)

ตวงกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ละลายในเมทานอล 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างระมัดระวัง

* ทำให้สารละลายผสมเข้ากันอย่างสมบูรณ์ โดยตั้งสารละลายที่ผสมกันแล้วมากกว่า 4 ชั่วโมงหรือทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนนำมาใช้ในขั้นตอนเมททิลเลชั่นของกรดไขมัน

5. การเตรียมสารละลาย Butylated Hydroxy Toluene (BHT) 0.01 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในเฮกเซน ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (0.01 % (w/v) BHT in Hexane)

ชั่ง BHT 10 กรัม ละลายในเฮกเซน 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเก็บสารละลายในขวดสีชา

6. การเตรียมสารละลาย 3, 5 Dinitrosalicylic (DNS)

NaOH	16	กรัม
Rochelle salt (K-Na tartate)	300	กรัม
3, 5 Dinitrosalicylic acid (DNS)	1	กรัม

ละลาย NaOH ในน้ำกลั่นอย่างสมบูรณ์ แล้วจึงละลาย Rochelle salt และ DNS ตามลำดับ ทิ้งไว้ให้สารละลายเย็นลง จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาและเก็บไว้ในที่มืด

7. การเตรียมสารละลาย tween 80 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (0.2% (w/v) tween 80)

ชั่งสารละลาย tween 80 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. ความเข้มข้นของเซลล์

1.1 ค่าความขุ่นเซลล์

นำตัวอย่างเซลล์แขวนลอยมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยอัตราการเจือจางที่เหมาะสมก่อนนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยค่าความขุ่นที่หมาะสมต่อการวัดควรอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 0.3

1.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง

1. เตรียมหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 2.0 มิลลิลิตร ที่สะอาดผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน จำนวน 6 หลอด

2. ดูดตัวอย่างเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง

3. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสจากการปั่นเหวี่ยง โดยแบ่งเก็บไว้ที่ 4 และ -20 องศาเซลเซียส

4. เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง เขย่าจนตะกอนเซลล์ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อล้างองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ติดอยู่กับตัวเซลล์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง

5. รินส่วนใสทิ้ง แล้วเติมน้ำกลั่นหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง

6. รินส่วนใสทิ้ง แล้วนำหลอดปั่นเหวี่ยงที่ทำการล้างตะกอนเซลล์แล้วทั้งหมดไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเซลล์แห้ง

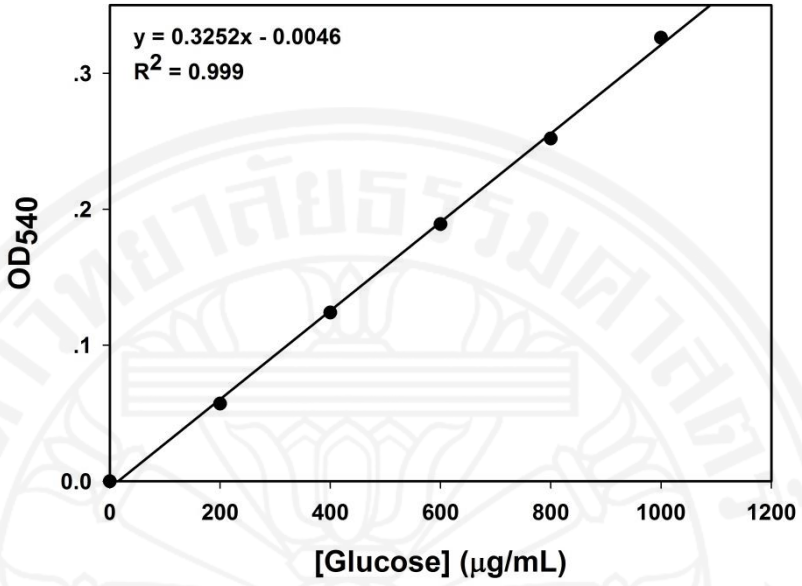
7. นำหลอดอบแห้งไปใส่ตู้ดูดความชื้นและทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำหลอดไปชั่งหาน้ำหนักเซลล์ที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำหน่ง

8. คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตรด้วยสูตรการคำนวณดังต่อไปนี้

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดที่มีเซลล์(กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอดเปล่า(กรัม)}}{\text{ปริมาตรของเซลล์แขวนลอย (มิลลิลิตร)} \times 10^{-3}}$$

<u>ภาพภาคผนวก ข-1</u>

กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส



ภาคผนวก ค

แหล่งของเชื้อ และไอโซเลต *Lactobacillus plantarum*

ตารางภาคผนวก ค

แสดงจำนวนเชื้อ แหล่งของเชื้อ และไอโซเลตของเชื้อ *L. plantarum* ที่นำมาใช้ในการทดลอง

Number	Group	Substrate	Name	BCC	Original code
1	1	Fermented beef	*Lactobacillus plantarum*	47648	NB10
2				47664	NB108
3				47697	NB273
4				47655	NB23
5				47702	NB302
6				47658	NB33
7				47659	NB34
8				47728	NB423
9				47720	NB394
10	2	Fermented pork	*Lactobacillus plantarum*	47684	NB189
11				47686	NB192
12				47687	NB200
13				47724	NB409
14	3	Beef sausage	*Lactobacillus plantarum*	47647	NB05
15				47654	NB22
16				47731	NB426
17	4	Pork sausage	*Lactobacillus plantarum*	47667	NB121
18				47650	NB13
19				47651	NB14
20				47670	NB142
21				47678	NB169

ตารางภาคผนวก ค (ต่อ)

แสดงจำนวนเชื้อ แหล่งของเชื้อ และไอโซเลตของเชื้อ *L. plantarum* ที่นำมาใช้ในการทดลอง

Number	Group	Substrate	Name	BCC	Original code
22	4	Pork sausage	*Lactobacillus plantarum*	47683	NB185
23				47698	NB281
24				47700	NB289
25				47701	NB295
26				47703	NB311
27				47704	NB324
28				47721	NB404
29				47727	NB421
30	5	Shrimp paste	*Lactobacillus plantarum*	47681	NB180
31				47682	NB182
32	6	Fermented shrimp	*Lactobacillus plantarum*	47690	NB229
33	7	Wild spider flower pickle	*Lactobacillus plantarum*	47653	NB17
34				47691	NB231
35				47718	NB384
36				47656	NB31
37				47723	NB406
38				47661	NB54
39	8	Cabbage pickle	*Lactobacillus plantarum*	47685	NB191
40	9	Shallot pickle	*Lactobacillus plantarum*	47726	NB419
41				47663	NB93
42				47730	NB425
43	10	Pickled cabbage	*Lactobacillus plantarum*	39798	NRIC1067
44	11	Fermented vegetable	*Lactobacillus plantarum*	42272	NB403

ภาคผนวก ง
ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางภาคผนวก ง-1

ข้อมูลการเติบโตของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลตในอาหาร MRS เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาตรกล้าเชื้อที่นำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ลำดับที่	ไอโซเลต	OD_{600}	Inoculation volume (mL)
1	NB10	8.70	0.4
2	NB108	8.27	0.4
3	NB273	3.71	0.5
4	NB23	6.59	0.5
5	NB302	7.42	0.4
6	NB33	10.07	0.4
7	NB34	9.01	0.4
8	NB423	8.63	0.4
9	NB394	9.27	0.4
10	NB189	9.30	0.4
11	NB192	8.44	0.4
12	NB200	8.30	0.4
13	NB409	11.50	0.4
14	NB05	8.69	0.4
15	NB22	7.74	0.4
16	NB426	8.35	0.4
17	NB121	8.32	0.4
18	NB13	9.68	0.4
19	NB14	8.04	0.4
20	NB142	6.31	0.5
21	NB169	9.50	0.4
22	NB185	7.01	0.4

ตารางภาคผนวก ง-1 (ต่อ)

ข้อมูลการเติบโตของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลตในอาหาร MRS เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาตรกล้าเชื้อที่นำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ลำดับที่	ไอโซเลต	OD_{600}	Inoculation volume (mL)
23	NB281	9.48	0.4
24	NB289	8.52	0.4
25	NB295	8.36	0.4
26	NB311	8.40	0.4
27	NB324	7.67	0.4
28	NB404	9.53	0.4
29	NB421	8.46	0.4
30	NB180	9.52	0.4
31	NB182	9.39	0.4
32	NB229	7.70	0.4
33	NB17	9.43	0.4
34	NB231	9.55	0.4
35	NB384	9.27	0.4
36	NB31	9.15	0.4
37	NB406	12.51	0.4
38	NB54	8.53	0.4
39	NB191	8.66	0.4
40	NB419	9.96	0.4
41	NB93	8.76	0.4
42	NB425	9.44	0.4
43	NRIC1067	6.59	0.5
44	NB403	9.72	0.4

1. ข้อมูลจากการทดลองส่วนที่ I

<u>ตารางภาคผนวก ง-2</u>

ข้อมูลคุณลักษณะของ *L.plantarum* แต่ละไอโซเลตและปริมาณการผลิต CLA เมื่อเลี้ยงในอาหาร MMRS

ข้อมูลการเพาะเลี้ยง / ไอโซเลต	NB10	NB108	NB273	NB23	NB302	NB33	NB34	NB423	NB394
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	8.6 ± 0.2	9.6 ± 0.1	6.1 ± 0.1	4.5 ± 0.1	9.2 ± 0.3	12.4 ± 0.1	9.5 ± 0.1	10.2 ± 0.8	8.5 ± 0.6
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	2.9 ± 0.0	2.8 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.0	2.5 ± 0.0	2.9 ± 0.0	2.9 ± 0.0	2.8 ± 0.0	3.3 ± 0.0
พีเอช	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.7 ± 0.0	3.8 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0
ปริมาณ CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
9CLA-1	3.3 ± 0.5	2.9 ± 0.0	2.5 ± 0.1	1.9 ± 0.2	0.5 ± 0.0	1.6 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.0
9CLA-2	0.6 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.9 ± 0.0	0	0	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0
10CLA	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.0	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.6 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.1 ± 0.0
CLA ทั้งหมด	5.8 ± 1.0	5.6 ± 0.0	4.5 ± 0.2	4.2 ± 0.1	3.1 ± 0.0	2.7 ± 0.0	2.9 ± 0.0	2.8 ± 0.0	2.5 ± 0.0
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	93.1 ± 2.7	83.7 ± 0.0	92.2 ± 1.5	92.9 ± 0.1	86.6 ± 0.0	74.0 ± 0.0	93.2 ± 9.6	38.1 ± 0.0	57.9 ± 0.0

<u>ตารางภาคผนวก ง-2 (ต่อ)</u>

ข้อมูลคุณลักษณะของ *L.plantarum* แต่ละไอโซเลตและปริมาณการผลิต CLA เมื่อเลี้ยงในอาหาร MMRS

ข้อมูลการเพาะเลี้ยง / ไอโซเลต	NB189	NB192	NB200	NB409	NB05	NB22	NB426	NB121	NB13
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	10.4 ± 0.4	8.2 ± 1.7	6.9 ± 0.0	9.1 ± 0.1	8.1± 0.0	8.6± 0.3	7.7± 0.1	7.0 ± 0.5	10.2 ± 0.0
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	3.4 ± 0.0	3.7 ± 0.0	2.8 ± 0.2	3.4 ± 0.0	2.4± 0.2	3.0± 0.0	2.6± 0.0	2.5 ± 0.1	2.0 ± 0.0
พีเอช	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.7 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.6± 0.0	3.6± 0.0	3.6± 0.0	3.5 ± 0.0	3.5 ± 0.0
ปริมาณ CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
9CLA-1	1.3 ± 0.0	3.8 ± 0.0	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.0	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0	2.1 ± 0.0	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.0
9CLA-2	0.8 ± 0.0	0	0.6 ± 0.0	0	0.7 ± 0.0	0.9 ± 0.2	0	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.0
10CLA	1.4 ± 0.0	1.6 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.5 ± 0.4	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.0	1.3 ± 0.1	0
CLA ทั้งหมด	3.5 ± 0.0	5.4 ± 0.0	3.4 ± 0.2	2.8 ± 0.0	2.9 ± 0.4	3.2 ± 1.0	3.3 ± 0.0	3.6 ± 0.8	2.5 ± 0.0
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	100	62.5 ± 0.0	54.9 ± 25.0	40.2 ± 0.0	88.3 ± 2.3	100	58.6 ± 0.0	100	19.5 ± 0.0

ตารางภาคผนวก ง -2 (ต่อ)

ข้อมูลคุณลักษณะของ *L.plantarum* แต่ละไอโซเลตและปริมาณการผลิต CLA เมื่อเลี้ยงในอาหาร MMRS

ข้อมูลการเพาะเลี้ยง / ไอโซเลต	NB14	NB142	NB169	NB185	NB281	NB289	NB295	NB311	NB324
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	10.1 ± 0.1	8.4 ± 0.6	8.2 ± 0.1	6.1 ± 0.1	6.9 ± 0.0	6.9 ± 0.2	8.8 ± 0.2	7.6 ± 0.4	7.1 ± 0.8
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	3.5 ± 0.0	2.5 ± 0.0	2.9 ± 0.0	2.1 ± 0.0	3.2 ± 0.1	1.8 ± 0.2	2.6 ± 0.0	2.3 ± 0.0	2.5 ± 0.1
พีเอช	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.7 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0
ปริมาณ CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
9CLA-1	0.9 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.9 ± 1.0	0.9 ± 1.3	0.6 ± 0.0	2.2 ± 0.8	1.8 ± 0.3
9CLA-2	0.6 ± 0.0	0	0.9 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.9 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.7
10CLA	1.3 ± 0.0	1.1 ± 0.0	0.7 ± 0.0	1.6 ± 0.0	1.3 ± 0.3	1.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0	1.3 ± 0.4	1.1 ± 0.6
CLA ทั้งหมด	2.8 ± 0.0	2.5 ± 0.0	2.8 ± 0.0	3.1 ± 0.0	3.7 ± 1.2	3.2 ± 0.4	2.2 ± 0.0	4.6 ± 1.2	4.2 ± 0.2
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	84.7 ± 0.0	86.1 ± 0.0	37.8 ± 0.0	37.8 ± 0.0	78.6 ± 2.7	87.0 ± 0.3	84.5 ± 0.0	89.1 ± 0.5	95.5 ± 6.4

<u>ตารางภาคผนวก ง-2 (ต่อ)</u>

ข้อมูลคุณลักษณะของ *L.plantarum* แต่ละไอโซเลตและปริมาณการผลิต CLA เมื่อเลี้ยงในอาหาร MMRS

ข้อมูลการเพาะเลี้ยง / ไอโซเลต	NB404	NB421	NB180	NB182	NB229	NB17	NB231	NB384	NB31
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	12.4 ± 0.1	12.2 ± 0.7	8.0 ± 0.4	9.4 ± 0.2	8.2 ± 0.8	9.0 ± 0.0	11.2 ± 0.4	9.7 ± 1.0	10.8 ± 0.3
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	3.4 ± 0.0	3.1 ± 0.0	2.8 ± 0.1	2.7 ± 0.0	3.7 ± 0.0	2.7 ± 0.0	3.2 ± 0.0	3.7 ± 0.1	2.1 ± 0.0
พีเอช	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.5 ± 0.0
ปริมาณ CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
9CLA-1	0.7 ± 0.0	1.1 ± 0.0	2.1 ± 0.1	0	2.8 ± 0.4	0	2.1 ± 0.0	2.4 ± 0.9	0.7 ± 0.0
9CLA-2	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.9 ± 0.0
10CLA	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.0	1.7 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.4 ± 0.2	0.9 ± 0.0
CLA ทั้งหมด	2.4 ± 0.0	3.0 ± 0.0	4.0 ± 0.2	1.9 ± 0.0	4.7 ± 0.2	2.0 ± 0.0	4.1 ± 0.0	4.1 ± 1.5	2.5 ± 0.0
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	84.3 ± 0.0	86.8 ± 0.0	95.9 ± 5.8	43.6 ± 0.0	88.2 ± 7.0	32.3 ± 0.0	90.3 ± 0.0	82.5 ± 4.6	100

ตารางภาคผนวก ง-2 (ต่อ)

ข้อมูลคุณลักษณะของ *L.plantarum* แต่ละไอโซเลตและปริมาณการผลิต CLA เมื่อเลี้ยงในอาหาร MMRS

ข้อมูลการเพาะเลี้ยง / ไอโซเลต	NB406	NB54	NB191	NB419	NB93	NB425	NRIC 1067	NB403
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	10.2 ± 0.9	7.4 ± 0.1	9.9 ± 0.1	12.7 ± 1.1	8.0 ± 0.4	9.3 ± 0.7	9.0 ± 0.2	10.3 ± 0.4
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	3.6 ± 0.1	2.5 ± 0.1	3.4 ± 0.1	4.3 ± 0.0	2.2 ± 0.0	2.8 ± 0.2	1.9 ± 0.0	2.8 ± 0.2
พีเอช	3.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0
ปริมาณ CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)								
9CLA-1	2.5 ± 0.7	2.6 ± 0.5	1.9 ± 0.2	1.4 ± 0.0	1.3 ± 0.0	2.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0	1.9 ± 0.2
9CLA-2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.2 ± 0.0
10CLA	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0	1.5 ± 0.2
CLA ทั้งหมด	5.0 ± 0.7	5.0 ± 0.6	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.0	3.1 ± 0.0	4.9 ± 0.0	2.2 ± 0.0	3.6 ± 0.6
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	87.5 ± 1.2	91.6 ± 2.0	92.2 ± 11.1	82.3 ± 0.0	25.2 ± 0.0	87.8 ± 0.0	66.9 ± 0.0	95.0 ± 7.0

ตารางภาคผนวก ง-3

ข้อมูลคุณลักษณะของ *L.plantarum* แต่ละไอโซเลตและปริมาณการผลิต CLA เมื่อเลี้ยงในอาหาร MMRS+LA

ข้อมูลการเพาะเลี้ยง / ไอโซเลต	NB10	NB108	NB273	NB23	NB302	NB33	NB34	NB423	NB394
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	6.6 ± 0.4	8.9 ± 0.4	5.8 ± 0.4	4.0 ± 0.3	9.0 ± 0.3	11.6 ± 0.4	9.7 ± 0.0	8.5 ± 0.0	7.7 ± 0.5
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	2.9 ± 0.0	2.4 ± 0.0	2.3 ± 0.4	2.2 ± 0.2	2.6 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.9 ± 0.4
พีเอช	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.7 ± 0.0	3.9 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0
ปริมาณ CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
9CLA-1	3.9 ± 0.5	3.8 ± 0.4	2.9 ± 0.1	2.5 ± 0.2	3.2 ± 0.0	1.8 ± 0.3	2.6 ± 0.2	2.3 ± 0.7	2.2 ± 0.4
9CLA-2	0.5 ± 0.2	1.0 ± 0.3	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.4	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.0
10CLA	2.0 ± 0.1	2.2 ± 0.0	2.3 ± 0.1	1.8 ± 0.3	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.3	2.0 ± 0.1	1.5 ± 0.4	1.3 ± 0.4
CLA ทั้งหมด	6.4 ± 0.4	7.0 ± 0.1	6.0 ± 0.0	4.5 ± 0.1	5.6 ± 0.1	4.1 ± 0.2	4.8 ± 0.5	4.4 ± 1.2	4.0 ± 1.4
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	5.1 ± 0.2	6.5 ± 0.3	4.7 ± 0.1	3. 9 ± 0.1	3.9 ± 0.1	3.2 ± 0.2	4.0 ± 0.4	3.5 ± 0.9	3.0 ± 1.0

ตารางภาคผนวก ง-3 (ต่อ)

ข้อมูลคุณลักษณะของ *L.plantarum* แต่ละไอโซเลตและปริมาณการผลิต CLA เมื่อเลี้ยงในอาหาร MMRS+LA

ข้อมูลการเพาะเลี้ยง / ไอโซเลต	NB189	NB192	NB200	NB409	NB05	NB22	NB426	NB121	NB13
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	9.0 ± 0.7	7.4 ± 0.5	8.0 ± 0.5	8.6 ± 0.4	8.0 ± 0.1	8.1 ± 0.4	7.6 ± 0.1	6.0 ± 0.1	9.0 ± 0.4
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	2.8 ± 0.1	3.0 ± 0.2	2.2 ± 0.4	2.7 ± 0.0	2.4 ± 0.0	2.6 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.0	2.8 ± 0.0
พีเอช	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.7 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.5 ± 0.0
ปริมาณ CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
9CLA-1	2.2 ± 0.2	3.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.1 ± 1.1	24.1 ± 2.0	3.1 ± 0.1	3.2 ± 1.4	3.1 ± 0.4	2.0 ± 0.1
9CLA-2	0.5 ± 0.2	0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	8.1 ± 0.8	0	0.2 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0
10CLA	1.5 ± 0.0	1.9 ± 0.0	1.4 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.5 ± 0.0	1.9 ± 0.2	1.5 ± 0.7	1.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1
CLA ทั้งหมด	4.2 ± 0.6	5.3 ± 0.0	3.9 ± 0.4	3.2 ± 0.6	32.7 ± 2.0	5.0 ± 0.1	4.9 ± 1.8	5.2 ± 0.9	3.3 ± 0.3
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	3.3 ± 0.3	4.9 ± 0.0	3.9 ± 0.4	2.2 ± 0.8	25.9 ± 0.4	4.0 ± 0.1	3.4 ± 1.3	4.6 ± 0.5	3.4 ± 0.0

ตารางภาคผนวก ง-3 (ต่อ)

ข้อมูลคุณลักษณะของ *L.plantarum* แต่ละไอโซเลตและปริมาณการผลิต CLA เมื่อเลี้ยงในอาหาร MMRS+LA

ข้อมูลการเพาะเลี้ยง / ไอโซเลต	NB14	NB142	NB169	NB185	NB281	NB289	NB295	NB311	NB324
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	9.7 ± 0.2	7.5 ± 0.0	7.6 ± 0.3	5.9 ± 0.1	9.6 ± 0.1	7.2 ± 0.4	8.5 ± 0.1	6.6 ± 0.6	6.4 ± 0.0
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	3.0 ± 0.3	2.1 ± 0.1	3.2 ± 0.0	2.1 ± 0.0	3.0 ± 0.3	1.7 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.3 ± 0.1	2.5 ± 0.1
พีเอช	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.7 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0
ปริมาณ CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
9CLA-1	1.3 ± 0.2	2.1 ± 0.3	2.7 ± 0.0	4.1 ± 0.5	2.5 ± 0.4	21.2 ± 0.8	5.6 ± 0.3	7.4 ± 0.1	7.6 ± 0.1
9CLA-2	1.5 ± 0.1	0	0	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.0	8.5 ± 0.2	1.8 ± 1.0	2.6 ± 0.2	2.7 ± 0.1
10CLA	1.6 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.0	1.2 ± 0.7	1.6 ± 0.2	2.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2	2.4 ± 0.3	2.2 ± 0.1
CLA ทั้งหมด	4.3 ± 1.7	3.1 ± 0.4	4.1 ± 0.0	5.7 ± 0.7	4.7 ± 0.6	32.7 ± 0.7	9.2 ± 0.4	12.4 ± 0.0	12.5 ± 0.1
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	3.9 ± 0.2	2.8 ± 0.4	3.2 ± 0.0	4.2 ± 0.8	4.4 ± 0.4	25.1 ± 0.7	7.2 ± 0.3	10.1 ± 0.2	10.0 ± 0.0

ตารางภาคผนวก ง-3 (ต่อ)

ข้อมูลคุณลักษณะของ *L.plantarum* แต่ละไอโซเลตและปริมาณการผลิต CLA
เมื่อเลี้ยงในอาหาร MMRS+LA

ข้อมูลการเพาะเลี้ยง / ไอโซเลต	NB404	NB421	NB180	NB182	NB229	NB17	NB231	NB384	NB31
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	11.1 ± 0.1	9.6 ± 0.1	7.7 ± 0.7	9.0 ± 0.4	8.4 ± 1.3	9.0 ± 0.1	9.4 ± 0.5	9.7 ± 0.6	10.6 ± 0.4
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	3.1 ± 0.1	3.1 ± 0.2	2.6 ± 0.1	2.5 ± 0.0	2.9 ± 0.4	2.7 ± 0.3	2.9 ± 0.1	3.2 ± 0.3	2.1 ± 0.0
พีเอช	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0
ปริมาณ CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
9CLA-1	1.9 ± 0.1	2.2 ± 0.1	3.9 ± 0.3	3.3 ± 0.2	3.2 ± 0.1	2.7 ± 0.4	1.8 ± 0.2	3.0 ± 0.4	2.3 ± 0.2
9CLA-2	0.8 ± 0.0	0.2 ± 0.0	1.1 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.0	1.1 ± 0.6	0.8 ± 0.5	0.7 ± 0.0	1.1 ± 0.0
10CLA	1.3 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.5	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.0	1.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.7 ± 0.1
CLA ทั้งหมด	3.9 ± 1.1	4.0 ± 0.1	7.0 ± 0.6	5.5 ± 0.1	5.6 ± 0.0	5.7 ± 0.4	3.8 ± 0.1	5.3 ± 1.0	5.1 ± 0.3
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	3.4 ± 0.9	3.0 ± 0.1	6.7 ± 0.5	4.5 ± 0.0	5.0 ± 0.2	4.5 ± 0.0	3.1 ± 0.0	5.3 ± 1.0	3.8 ± 0.3

ตารางภาคผนวก ง-3 (ต่อ)

ข้อมูลคุณลักษณะของ *L.plantarum* แต่ละไอโซเลตและปริมาณการผลิต CLA เมื่อเลี้ยงในอาหาร MMRS+LA

ข้อมูลการเพาะเลี้ยง / ไอโซเลต	NB406	NB54	NB191	NB419	NB93	NB425	NRIC 1067	NB403
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	9.5 ± 0.1	7.5 ± 0.6	8.8 ± 0.1	10.9 ± 0.6	7.5 ± 0.4	8.8 ± 0.4	7.3 ± 0.8	9.4 ± 0.1
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	3.3 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.8 ± 0.0	3.5 ± 0.1	2.1 ± 0.2	3.1 ± 0.2	1.5 ± 0.2	2.9 ± 0.1
พีเอช	3.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0
ปริมาณ CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)								
9CLA-1	3.5 ± 0.6	3.5 ± 0.6	2.9 ± 0.2	2.4 ± 0.2	2.8 ± 0.5	2.6 ± 0.0	2.1 ± 0.3	2.7 ± 0.1
9CLA-2	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.2 ± 0.5	0.9 ± 0.0
10CLA	2.1 ± 0.3	2.2 ± 0.0	1.9 ± 0.1	1.4 ± 0.0	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.0	1.5 ± 0.2	2.1 ± 0.4
CLA ทั้งหมด	6.1 ± 0.8	6.7 ± 0.6	5.5 ± 0.3	4.1 ± 0.2	5.2 ± 1.5	4.9 ± 0.0	4.8 ± 0.1	5.3 ± 0.2
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	5.4 ± 0.5	5.8 ± 0.2	5.2 ± 0.1	2.9 ± 0.0	3.6 ± 1.2	4.1 ± 0.1	3.5 ± 0.1	4.3 ± 0.2

ตารางภาคผนวก ง-4

การเจริญเติบโต น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าพีเอช ของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS และ MMRS+LA ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36 ชม.

ลำดับที่	ไอโซเลต	อาหาร MMRS			อาหาร MMRS+LA		
		A_{600}	DCW (g/L)	final pH	A_{600}	DCW (g/L)	final pH
1	NB10	8.6 ± 0.2	2.9 ± 0.0	3.6 ± 0.0	6.6 ± 0.4	2.9 ± 0.0	3.6 ± 0.0
2	NB108	9.6 ± 0.1	2.8 ± 0.0	3.5 ± 0.0	8.9 ± 0.4	2.4 ± 0.0	3.5 ± 0.0
3	NB273	6.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1	3.7 ± 0.0	5.8 ± 0.4	2.3 ± 0.4	3.7 ± 0.0
4	NB23	4.5 ± 0.1	2.2 ± 0.0	3.8 ± 0.0	4.0 ± 0.3	2.2 ± 0.2	3.9 ± 0.0
5	NB302	9.2 ± 0.3	2.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0	9.0 ± 0.3	2.6 ± 0.1	3.6 ± 0.0
6	NB33	12.4 ± 0.1	2.9 ± 0.0	3.6 ± 0.0	11.6 ± 0.4	2.8 ± 0.1	3.6 ± 0.0
7	NB34	9.5 ± 0.1	2.9 ± 0.0	3.6 ± 0.0	9.7 ± 0.0	2.7 ± 0.1	3.6 ± 0.0
8	NB423	10.2 ± 0.8	2.8 ± 0.0	3.6 ± 0.0	8.5 ± 0.1	2.8 ± 0.2	3.5 ± 0.0
9	NB394	8.5 ± 0.6	3.3 ± 0.0	3.6 ± 0.0	7.7 ± 0.5	2.9 ± 0.4	3.6 ± 0.0
10	NB189	10.4 ± 0.4	3.4 ± 0.0	3.6 ± 0.0	9.0 ± 0.7	2.8 ± 0.1	3.6 ± 0.0
11	NB192	8.2 ± 1.7	3.7 ± 0.0	3.5 ± 0.0	7.4 ± 0.5	3.0 ± 0.2	3.5 ± 0.0
12	NB200	6.9 ± 0.0	2.8 ± 0.2	3.7 ± 0.0	8.0 ± 0.5	2.2 ± 0.4	3.6 ± 0.0
13	NB409	9.1 ± 0.1	3.4 ± 0.0	3.5 ± 0.0	8.6 ± 0.4	2.7 ± 0.0	3.6 ± 0.0
14	NB05	8.1 ± 0.0	2.4 ± 0.2	3.6 ± 0.0	8.0 ± 0.1	2.3 ± 0.1	3.7 ± 0.0
15	NB22	8.6 ± 0.3	3.0 ± 0.0	3.6 ± 0.0	8.1 ± 0.4	2.6 ± 0.1	3.6 ± 0.0
16	NB426	7.7 ± 0.1	2.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	7.6 ± 0.1	2.3 ± 0.2	3.6 ± 0.0
17	NB121	7.0 ± 0.5	2.5 ± 0.1	3.5 ± 0.0	6.0 ± 0.1	2.4 ± 0.0	3.5 ± 0.0
18	NB13	10.2 ± 0.0	3.0 ± 0.0	3.5 ± 0.0	9.0 ± 0.4	2.8 ± 0.0	3.5 ± 0.0
19	NB14	10.1 ± 0.1	3.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0	9.7 ± 0.2	3.0 ± 0.3	3.6 ± 0.0
20	NB142	8.4 ± 0.6	2.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0	7.5 ± 0.0	2.1 ± 0.1	3.6 ± 0.0
21	NB169	8.2 ± 0.1	2.9 ± 0.0	3.6 ± 0.0	7.6 ± 0.3	3.2 ± 0.0	3.6 ± 0.0
22	NB185	6.1 ± 0.1	2.1 ± 0.0	3.6 ± 0.0	5.9 ± 0.1	2.1 ± 0.0	3.6 ± 0.0
23	NB281	6.9 ± 0.0	3.2 ± 0.1	3.7 ± 0.0	9.6 ± 0.1	3.0 ± 0.3	3.5 ± 0.0
24	NB289	6.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2	3.6 ± 0.0	6.7 ± 0.4	1.7 ± 0.0	3.6 ± 0.0
25	NB295	8.8 ± 0.2	2.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	8.5 ± 0.1	2.0 ± 0.0	3.6 ± 0.0
26	NB311	7.6 ± 0.4	2.3 ± 0.0	3.6 ± 0.0	6.6 ± 0.6	2.3 ± 0.1	3.6 ± 0.0

ตารางภาคผนวก ง-4 (ต่อ)

การเจริญเติบโต น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าพีเอช ของ *L. plantarum* แต่ละไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS และ MMRS+LA ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36 ชม.

ลำดับที่	ไอโซเลต	อาหาร MMRS			อาหาร MMRS+LA		
		A_{600}	DCW (g/L)	final pH	A_{600}	DCW (g/L)	final pH
27	NB324	7.1 ± 0.8	2.5 ± 0.1	3.6 ± 0.0	6.4 ± 0.0	2.5 ± 0.1	3.6 ± 0.0
28	NB404	12.4 ± 0.1	3.4 ± 0.0	3.6 ± 0.0	11.1 ± 0.1	3.1 ± 0.1	3.6 ± 0.0
29	NB421	12.2 ± 0.7	3.1 ± 0.0	3.5 ± 0.0	9.6 ± 0.1	3.1 ± 0.2	3.6 ± 0.0
30	NB180	8.0 ± 0.4	2.7 ± 0.0	3.5 ± 0.0	7.7 ± 0.7	2.7 ± 0.3	3.5 ± 0.0
31	NB182	9.4 ± 0.2	3.2 ± 0.0	3.6 ± 0.0	9.0 ± 0.4	2.9 ± 0.1	3.6 ± 0.0
32	NB229	8.2 ± 0.8	3.7 ± 0.1	3.5 ± 0.0	8.4 ± 1.3	3.2 ± 0.3	3.5 ± 0.0
33	NB17	9.0 ± 0.0	2.1 ± 0.0	3.5 ± 0.0	9.0 ± 0.1	2.1 ± 0.0	3.6 ± 0.0
34	NB231	11.2 ± 0.4	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.0	9.4 ± 0.5	3.3 ± 0.2	3.5 ± 0.0
35	NB384	9.7 ± 1.0	2.5 ± 0.1	3.5 ± 0.0	9.7 ± 0.6	2.4 ± 0.1	3.5 ± 0.0
36	NB31	10.8 ± 0.3	3.4 ± 0.1	3.5 ± 0.0	10.6 ± 0.4	2.8 ± 0.0	3.6 ± 0.0
37	NB406	10.2 ± 0.9	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.0	9.5 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.5 ± 0.0
38	NB54	7.4 ± 0.1	2.2 ± 0.0	3.6 ± 0.0	7.5 ± 0.6	2.1 ± 0.2	3.6 ± 0.0
39	NB191	9.9 ± 0.1	3.0 ± 0.0	3.5 ± 0.0	8.8 ± 0.1	3.1 ± 0.2	3.5 ± 0.0
40	NB419	12.7 ± 1.1	4.3 ± 0.0	3.6 ± 0.0	10.9 ± 0.6	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.0
41	NB93	8.0 ± 0.4	2.8 ± 0.2	3.6 ± 0.0	7.5 ± 0.4	2.9 ± 0.1	3.6 ± 0.0
42	NB425	9.3 ± 0.7	2.8 ± 0.1	3.6 ± 0.0	8.8 ± 0.4	2.6 ± 0.1	3.6 ± 0.0
43	NRIC1067	9.0 ± 0.2	1.9 ± 0.0	3.6 ± 0.0	7.3 ± 0.8	1.5 ± 0.2	3.6 ± 0.0
44	NB403	10.3 ± 0.4	3.7 ± 0.0	3.6 ± 0.0	9.4 ± 0.1	2.9 ± 0.4	3.6 ± 0.0

ตารางภาคผนวก ง-5

ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดเมื่อเพาะเลี้ยง *L.plantarum* แต่ละไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS และ MMRS+LA ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36 ชม.

ลำดับที่	ไอโซเลต	อาหาร MMRS		อาหาร MMRS+LA	
		total Fatty Acid (μg/mL)	total FAs Yield (mg/g_{cell})	total Fatty Acid (μg/mL)	total FAs Yield (mg/g_{cell})
1	NB10	94.1 ± 5.0	32.4 ± 1.7	244.1 ± 6.7	84.2 ± 2.3
2	NB108	138.0 ± 0.0	50.2 ± 0.0	259.1 ± 0.9	106.9 ± 4.3
3	NB273	93.4 ± 4.4	4.3 ± 0.2	248.3 ± 4.9	110.4 ± 9.5
4	NB23	107.2 ± 2.8	49.3 ± 2.1	253.4 ± 1.7	113.9 ± 9.8
5	NB302	109.5 ± 0.0	44.7 ± 0.4	312.3 ± 9.5	120.1 ± 8.3
6	NB33	68.9 ± 0.0	24.2 ± 0.2	279.3 ± 5.5	100.6 ± 5.8
7	NB34	107.7 ± 0.0	37.8 ± 0.0	245.5 ± 7.2	90.9 ± 8.7
8	NB423	92.0 ± 0.0	33.5 ± 0.3	274.0 ± 5.2	97.0 ± 5.0
9	NB394	92.5 ± 0.0	28.0 ± 0.2	275.4 ± 6.9	96.6 ± 4.4
10	NB189	93.6 ± 0.0	27.9 ± 0.2	316.7 ± 0.3	115.2 ± 4.2
11	NB192	138.5 ± 0.0	37.4 ± 0.0	257.0 ± 4.9	86.4 ± 5.6
12	NB200	89.1 ± 9.1	31.6 ± 5.2	231.3 ± 7.9	103.9 ± 0.7
13	NB409	86.6 ± 0.0	25.9 ± 0.2	272.6 ± 6.6	101.9 ± 3.8
14	NB05	102.8 ± 1.1	42.8 ± 8.4	279.3 ± 4.4	121.5 ± 3.7
15	NB22	92.0 ± 0.4	30.9 ± 7.2	254.3 ± 8.6	96.9 ± 1.0
16	NB426	96.7 ± 0.0	37.2 ± 0.3	321.0 ± 9.9	142.7 ± 5.6
17	NB121	97.4 ± 3.7	39.4 ± 1.3	229.3 ± 7.9	96.5 ± 7.4
18	NB13	76.7 ± 0.0	25.6 ± 0.0	206.9 ± 1.0	73.3 ± 1.3
19	NB14	88.4 ± 0.0	25.6 ± 0.2	260.3 ± 9.7	87.5 ± 9.3
20	NB142	90.6 ± 0.0	36.2 ± 0.3	243.4 ± 8.1	115.9 ± 5.9
21	NB169	113.4 ± 0.0	39.1 ± 0.3	313.2 ± 0.0	97.9 ± 0.0
22	NB185	99.9 ± 0.0	47.6 ± 0.5	315.4 ± 1.1	152.0 ± 8.0
23	NB281	102.3 ± 9.9	32.5 ±4.1	242.1 ± 7.4	82.1 ± 7.2
24	NB289	113.0 ± 7.4	61.9 ± 1.0	289.2 ± 1.1	170.1 ± 8.3
25	NB295	92.4 ± 0.0	35.5 ± 0.3	306.5 ± 1.9	151.4 ± 8.5

ตารางภาคผนวก ง-5 (ต่อ)

ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและผลได้ของกรดไขมันทั้งหมดเมื่อเพาะเลี้ยง *L.plantarum* แต่ละไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS และ MMRS+LA ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36 ชม.

ลำดับที่	ไอโซเลต	อาหาร MMRS		อาหาร MMRS+LA	
		total Fatty Acid (μg/mL)	total FAs Yield (mg/g_{cell})	total Fatty Acid (μg/mL)	total FAs Yield (mg/g_{cell})
26	NB311	127.0 ± 6.3	54.6 ± 0.7	287.3 ± 2.8	127.7 ± 4.2
27	NB324	120.8 ± 8.0	49.3 ± 6.9	279.8 ± 0.8	114.2 ± 5.9
28	NB404	86.8 ± 0.0	25.9 ± 0.2	283.1 ± 7.3	92.8 ± 4.5
29	NB421	85.2 ± 0.0	27.5 ± 0.2	278.8 ± 2.9	91.4 ± 7.3
30	NB180	105.6 ± 3.9	38.4 ± 7.0	243.9 ± 7.6	92.9 ± 4.3
31	NB182	97.1 ± 0.0	36.0 ± 0.3	259.1 ± 2.9	102.6 ± 6.6
32	NB229	110.9 ± 7.6	30.2 ± 7.5	251.5 ± 6.6	88.2 ± 2.5
33	NB17	93.3 ± 0.0	35.2 ± 0.3	305.3 ± 7.0	115.2 ± 4.9
34	NB231	93.9 ± 0.0	29.8 ± 0.2	265.2 ± 0.3	92.3 ± 7.0
35	NB384	99.9 ± 5.8	27.4 ± 7.6	235.4 ± 6.7	74.7 ± 2.0
36	NB31	89.0 ± 0.0	42.4 ± 0.4	325.3 ± 2.7	153.1 ± 8.5
37	NB406	106.0 ± 6.2	29.3 ± 8.1	254.0 ± 2.9	77.6 ± 4.2
38	NB54	110.0 ± 3.0	44.9 ± 2.0	260.7 ± 1.2	110.9 ± 6.6
39	NB191	96.5 ± 8.4	28.8 ± 9.7	233.9 ± 1.2	83.5 ± 1.1
40	NB419	79.5 ± 0.0	18.7 ± 0.1	260.9 ± 2.0	75.6 ± 2.1
41	NB93	106.5 ± 0.0	49.5 ± 0.5	337.1 ± 8.3	158.6 ± 7.1
42	NB425	106.9 ± 0.0	35.6 ± 0.0	243.1 ± 8.6	78.4 ± 1.4
43	NRIC1067	91.0 ± 0.0	49.2 ± 0.6	322.2 ± 7.2	222.2 ± 4.3
44	NB403	92.4 ± 3.8	33.0 ± 7.4	244.5 ± 7.1	85.8 ± 4.6

ตารางภาคผนวก ง-6

ความเข้มข้นของ CLA ทั้งหมด ผลได้ CLA จากเซลล์ และร้อยละของ CLA ที่เป็นองค์ประกอบในกรดไขมันทั้งหมดของ *L.plantarum* แต่ละไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS และ MMRS+LA ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36 ชม.

ลำดับที่	ไอโซเลต	อาหาร MMRS			อาหาร MMRS+LA		
		total CLA (μg/mL)	CLA yield $Y_{p/x}$ (mg/g_{cell})	CLA content (% in TFA)	total CLA (μg/mL)	CLA yield $Y_{p/x}$ (mg/g_{cell})	CLA content (% in TFA)
1	NB10	5.8 ± 1.0	2.0 ± 0.3	6.2 ± 1.0	6.4 ± 0.4	2.2 ± 0.1	2.6 ± 0.2
2	NB108	5.6 ± 0.0	2.0 ± 0.0	4.1 ± 0.0	7.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.7 ± 0.1
3	NB273	4.5 ± 0.2	0.2 ± 0.0	4.9 ± 0.3	6.0 ± 0.0	2.7 ± 0.4	2.4 ± 0.4
4	NB23	4.2 ± 0.1	1.9 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.5 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.2
5	NB302	3.1 ± 0.0	1.3 ± 0.0	2.8 ± 0.0	5.6 ± 0.1	2.2 ± 0.1	1.8 ± 0.1
6	NB33	2.7 ± 0.0	1.0 ± 0.0	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1
7	NB34	2.9 ± 0.0	1.0 ± 0.0	2.7 ± 0.0	4.8 ± 0.5	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.3
8	NB423	2.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0	3.1 ± 0.0	4.4 ± 1.2	1.6 ± 0.5	1.6 ± 0.5
9	NB394	2.5 ± 0.0	0.8 ± 0.0	2.7 ± 0.0	4.0 ± 1.4	1.4 ± 0.7	1.4 ± 0.7
10	NB189	3.5 ± 0.0	1.1 ± 0.0	3.8 ± 0.0	4.2 ± 0.6	1.5 ± 0.3	1.3 ± 0.3
11	NB192	5.4 ± 0.0	1.5 ± 0.0	3.9 ± 0.0	5.3 ± 0.0	1.8 ± 0.1	2.1 ± 0.2
12	NB200	3.4 ± 0.2	1.2 ± 0.1	3.8 ± 0.4	3.9 ± 0.4	1.8 ± 0.5	1.7 ± 0.5
13	NB409	2.8 ± 0.0	0.8 ± 0.0	3.2 ± 0.0	3.2 ± 0.6	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.2
14	NB05	2.9 ± 0.4	1.2 ± 0.3	2.8 ± 0.7	32.7 ± 2.0	14.2 ± 1.8	11.7 ± 1.5
15	NB22	3.2 ± 1.0	1.1 ± 0.3	3.4 ± 1.1	5.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.1
16	NB426	3.3 ± 0.0	1.3 ± 0.0	3.4 ± 0.0	4.9 ± 1.8	2.2 ± 1.0	1.5 ± 0.7
17	NB121	3.6 ± 0.8	1.4 ± 0.4	3.6 ± 0.9	5.2 ± 0.9	2.2 ± 0.4	2.2 ± 0.4
18	NB13	2.5 ± 0.0	0.8 ± 0.0	3.2 ± 0.0	3.3 ± 0.3	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.1
19	NB14	2.8 ± 0.0	0.8 ± 0.0	3.1 ± 0.0	4.3 ± 1.7	1.5 ± 0.7	1.7 ± 0.8
20	NB142	2.5 ± 0.0	1.0 ± 0.0	2.8 ± 0.0	3.1 ± 0.4	1.5 ± 0.3	1.3 ± 0.3
21	NB169	2.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0	2.4 ± 0.0	4.1 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.0
22	NB185	3.1 ± 0.0	1.5 ± 0.0	3.1 ± 0.1	5.7 ± 0.7	2.7 ± 0.4	1.8 ± 0.3
23	NB281	3.7 ± 1.2	1.2 ± 0.4	3.6 ± 1.4	4.7 ± 0.6	1.6 ± 0.4	1.9 ± 0.4
24	NB289	3.2 ± 0.4	1.7 ± 0.4	2.8 ± 0.6	32.7 ± 0.7	19.2 ± 0.4	11.3 ± 0.2

ตารางภาคผนวก ง-6 (ต่อ)

ความเข้มข้นของ CLA ทั้งหมด ผลได้ CLA จากเซลล์ และร้อยละของ CLA ที่เป็นองค์ประกอบในกรดไขมันทั้งหมดของ *L.plantarum* แต่ละไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS และ MMRS+LA ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36 ชม.

ลำดับที่	ไอโซเลต	อาหาร MMRS			อาหาร MMRS+LA		
		total CLA (µg/mL)	CLA yield $Y_{p/x}$ (mg/g_{cell})	CLA content (% in TFA)	total CLA (µg/mL)	CLA yield $Y_{p/x}$ (mg/g_{cell})	CLA content (% in TFA)
25	NB295	2.2 ± 0.0	0.8 ± 0.0	2.3 ± 0.0	9.2 ± 0.4	4.6 ± 0.3	3.0 ± 0.2
26	NB311	4.6 ± 1.2	2.0 ± 0.6	3.6 ± 1.0	12.4 ± 0.0	5.5 ± 0.2	4.3 ± 0.1
27	NB324	4.2 ± 0.2	1.7 ± 0.1	3.4 ± 0.3	12.5 ± 0.1	5.1 ± 0.2	4.5 ± 0.1
28	NB404	2.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0	2.8 ± 0.0	3.9 ± 1.1	1.3 ± 0.4	1.4 ± 0.4
29	NB421	3.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	3.5 ± 0.0	4.0 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1
30	NB180	4.0 ± 0.2	1.5 ± 0.2	3.8 ± 0.4	7.0 ± 0.6	2.7 ± 0.3	2.9 ± 0.4
31	NB182	1.9 ± 0.0	0.7 ± 0.0	1.9 ± 0.0	5.5 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1
32	NB229	4.7 ± 0.2	1.3 ± 0.0	4.3 ± 0.2	5.6 ± 0.0	2.0 ± 0.3	2.2 ± 0.3
33	NB17	2.0 ± 0.0	0.7 ± 0.0	2.1 ± 0.0	5.7 ± 0.4	2.2 ± 0.4	1.9 ± 0.3
34	NB231	4.1 ± 0.0	1.3 ± 0.0	4.4 ± 0.1	3.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1
35	NB384	4.1 ± 1.5	1.1 ± 0.4	4.1 ± 1.6	5.3 ± 1.0	1.7 ± 0.5	2.2 ± 0.6
36	NB31	2.5 ± 0.0	1.2 ± 0.0	2.8 ± 0.0	5.1 ± 0.3	2.4 ± 0.2	1.6 ± 0.1
37	NB406	5.0 ± 0.7	1.4 ± 0.2	4.7 ± 0.8	6.1 ± 0.8	1.9 ± 0.3	2.4 ± 0.4
38	NB54	5.0 ± 0.6	2.0 ± 0.4	4.6 ± 0.8	6.7 ± 0.6	2.9 ± 0.4	2.6 ± 0.3
39	NB191	3.4 ± 0.1	1.0 ± 0.1	3.5 ± 0.2	5.5 ± 0.3	2.0 ± 0.1	2.3 ± 0.1
40	NB419	3.3 ± 0.0	0.8 ± 0.0	4.1 ± 0.0	4.1 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.1
41	NB93	3.1 ± 0.0	1.5 ± 0.0	2.9 ± 0.0	5.2 ± 1.5	2.4 ± 1.0	1.5 ± 0.6
42	NB425	4.9 ± 0.0	1.6 ± 0.0	4.5 ± 0.0	4.9 ± 0.0	1.6 ± 0.1	2.0 ± 0.2
43	NRIC1067	2.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0	2.4 ± 0.0	4.8 ± 0.1	3.3 ± 0.6	1.5 ± 0.2
44	NB403	3.6 ± 0.6	1.3 ± 0.3	3.9 ± 0.9	5.3 ± 0.2	1.8 ± 0.1	2.2 ± 0.1

ตารางภาคผนวก ง-7

ร้อยละผลิตภัณฑ์ CLA ที่ผลิตได้ของ CLA ทั้งหมดจาก *L.plantarum* แต่ละไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS และ MMRS+LA ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36 ชม.

ลำดับที่	ไอโซเลต	อาหาร MMRS			อาหาร MMRS+LA		
		9CLA-1	9CLA-2	10CLA	9CLA-1	9CLA-2	10CLA
1	NB10	55.9 ± 9.6	9.7 ± 5.6	34.4 ± 9.9	61.9 ± 4.0	7.2 ± 2.8	30.8 ± 2.8
2	NB108	52.1 ± 0.0	15.8 ± 0.0	32.1 ± 0.0	54.5 ± 1.2	14.4 ± 4.5	31.0 ± 0.9
3	NB273	53.9 ± 2.9	20.0 ± 2.3	26.1 ± 4.5	48.8 ± 0.4	12.2 ± 0.5	39.1 ± 1.5
4	NB23	45.9 ± 0.7	24.8 ± 1.7	29.3 ± 5.1	54.5 ± 1.1	11.0 ± 0.2	40.1 ± 6.4
5	NB302	17.0 ± 0.1	62.7 ± 1.1	20.3 ± 0.8	57.4 ± 1.0	11.3 ± 2.0	29.3 ± 1.4
6	NB33	60.4 ± 0.5	0	39.6 ± 1.0	45.0 ± 2.7	25.3 ± 0.8	29.7 ± 9.4
7	NB34	62.1 ± 0.0	0	41.4 ± 0.0	53.7 ± 5.7	8.4 ± 0.9	42.2 ± 5.5
8	NB423	34.8 ± 0.3	15.6 ± 0.8	49.6 ± 1.1	51.1 ± 4.0	14.5 ± 5.1	34.4 ± 8.9
9	NB394	34.1 ± 0.3	21.2 ± 1.0	44.7 ± 1.2	56.3 ± 9.6	10.6 ± 3.6	33.1 ± 0.2
10	NB189	36.9 ± 0.2	23.0 ± 0.7	40.1 ± 0.8	53.2 ± 7.7	11.9 ± 1.7	34.9 ± 6.1
11	NB192	69.8 ± 0.0	0	30.2 ± 0.0	63.1 ± 0.1	0	35.8 ± 0.0
12	NB200	47.5 ± 2.5	18.6 ± 1.2	33.9 ± 3.1	57.2 ± 5.6	7.6 ± 0.7	35.8 ± 5.3
13	NB409	58.9 ± 0.4	0	41.1 ± 1.0	65.5 ± 3.1	6.7 ± 1.3	27.8 ± 5.2
14	NB05	27.5 ± 4.0	22.9 ± 3.0	50.3 ± 1.0	73.7 ± 6.1	24.9 ± 3.9	1.5 ± 2.2
15	NB22	31.7 ± 9.6	28.2 ± 5.3	39.7 ± 0.4	62.0 ± 1.3	0	38.0 ± 4.3
16	NB426	64.5 ± 0.4	0	35.5 ± 0.8	65.1 ± 5.4	4.0 ± 1.5	30.8 ± 6.6
17	NB121	55.4 ± 1.9	7.9 ± 2.9	36.6 ± 1.7	60.8 ± 1.2	13.6 ± 2.4	32.5 ± 7.1
18	NB13	73.0 ± 0.0	27.0 ± 0.0	0	61.3 ± 4.9	0	38.7 ± 6.9
19	NB14	31.0 ± 0.2	22.4 ± 0.9	46.6 ± 1.1	28.9 ± 1.6	34.5 ± 6.1	36.6 ± 6.0
20	NB142	56.4 ± 0.5	0	43.6 ± 1.2	66.6 ± 9.2	0	33.4 ± 8.2
21	NB169	43.2 ± 0.3	32.9 ± 1.0	23.9 ± 0.9	66.9 ± 0.0	0	33.1 ± 0.0
22	NB185	32.9 ± 0.2	16.9 ± 0.8	50.2 ± 1.0	73.3 ± 9.5	5.2 ± 0.8	21.5 ± 3.1
23	NB281	52.6 ± 8.1	12.9 ± 4.9	34.5 ± 8.6	52.9 ± 6.9	12.0 ± 1.8	35.1 ± 7.7
24	NB289	29.4 ± 4.3	18.6 ± 2.4	52.0 ± 9.0	64.9 ± 1.9	26.0 ± 1.2	8.7 ± 0.9
25	NB295	27.9 ± 0.3	43.7 ± 1.4	28.4 ± 1.2	60.7 ± 3.1	19.5 ± 1.5	19.8 ± 3.1

ตารางภาคผนวก ง-7 (ต่อ)

ร้อยละผลิตภัณฑ์ CLA ที่ผลิตได้ของ CLA ทั้งหมดจาก *L.plantarum*

แต่ละไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS และ MMRS+LA ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36 ชม.

ลำดับที่	ไอโซเลต	อาหาร MMRS			อาหาร MMRS+LA		
		9CLA-1	9CLA-2	10CLA	9CLA-1	9CLA-2	10CLA
26	NB311	48.4 ± 3.1	22.7 ± 6.4	28.9 ± 5.5	59.2 ± 0.1	21.1 ± 1.4	19.6 ± 2.4
27	NB324	44.4 ± 2.9	28.2 ± 7.2	27.4 ± 4.8	60.9 ± 0.3	21.7 ± 0.5	17.5 ± 0.8
28	NB404	29.0 ± 0.3	18.9 ± 1.0	52.1 ± 1.3	48.1 ± 3.4	19.4 ± 5.4	32.4 ± 0.3
29	NB421	37.4 ± 0.3	18.3 ± 0.8	44.3 ± 1.0	55.3 ± 2.0	5.0 ± 0.2	39.0 ± 2.5
30	NB180	0	47.5 ± 1.5	52.5 ± 1.6	47.7 ± 3.4	19.9 ± 2.1	32.5 ± 4.8
31	NB182	51.6 ± 0.3	18.4 ± 0.6	30.0 ± 0.6	47.8 ± 1.1	20.0 ± 2.3	32.2 ± 4.1
32	NB229	57.6 ± 2.1	7.8 ± 3.9	34.6 ± 6.7	57.8 ± 1.2	13.3 ± 2.5	35.6 ± 9.6
33	NB17	26.9 ± 0.2	35.8 ± 1.1	37.3 ± 1.1	45.1 ± 3.1	21.3 ± 1.8	33.6 ± 3.7
34	NB231	50.4 ± 7.5	19.3 ± 6.5	30.2 ± 9.4	57.3 ± 7.5	8.8 ± 3.1	33.9 ± 9.2
35	NB384	52.7 ± 6.6	19.2 ± 3.9	28.2 ± 4.8	52.7 ± 5.2	15.1 ± 2.0	32.2 ± 3.7
36	NB31	55.0 ± 1.3	10.0 ± 4.3	35.1 ± 0.0	53.7 ± 2.9	11.3 ± 0.7	35.1 ± 4.0
37	NB406	42.5 ± 0.3	22.9 ± 0.8	34.7 ± 0.8	58.7 ± 2.4	6.9 ± 0.4	34.3 ± 2.0
38	NB54	43.1 ± 0.3	15.5 ± 0.8	41.4 ± 0.9	55.0 ± 6.6	12.7 ± 1.8	32.3 ± 1.7
39	NB191	50.0 ± 0.0	17.3 ± 0.0	32.7 ± 0.0	52.5 ± 0.4	11.6 ± 0.7	35.9 ± 0.9
40	NB419	30.9 ± 0.3	37.3 ± 1.3	31.7 ± 1.2	43.0 ± 1.0	25.6 ± 1.0	31.3 ± 5.9
41	NB93	53.7 ± 8.8	5.6 ± 0.9	41.0 ± 0.9	51.2 ± 1.5	17.1 ± 0.5	40.0 ± 8.4
42	NB425	51.9 ± 3.0	16.7 ± 3.5	31.4 ± 8.2	55.1 ± 4.8	15.7 ± 2.6	21.5 ± 9.3
43	NRIC1067	0	34.6 ± 1.5	65.4 ± 1.8	60.1 ± 1.7	5.6 ± 0.1	34.3 ± 2.4
44	NB403	59.2 ± 2.4	5.2 ± 0.2	35.6 ± 4.3	55.8 ± 0.2	11.9 ± 0.5	32.3 ± 0.7

ตารางภาคผนวก ง-8

อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (เปอร์เซ็นต์) ของ *L.plantarum* แต่ละไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS และ MMRS+LA ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36 ชม.

ลำดับที่	ไอโซเลต	อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)
1	NB10	5.1 ± 0.2
2	NB108	6.5 ± 0.3
3	NB273	4.7 ± 0.1
4	NB23	3.9 ± 0.1
5	NB302	3.9 ± 0.1
6	NB33	3.2 ± 0.2
7	NB34	4.0 ± 0.4
8	NB423	3.5 ± 0.9
9	NB394	3.0 ± 1.0
10	NB189	3.3 ± 0.3
11	NB192	4.9 ± 0.0
12	NB200	3.9 ± 0.4
13	NB409	2.2 ± 0.8
14	NB05	25.9 ± 0.4
15	NB22	4.0 ± 0.1
16	NB426	3.4 ± 1.3
17	NB121	4.6 ± 0.5
18	NB13	3.4 ± 0.0
19	NB14	3.9 ± 1.2
20	NB142	2.8 ± 0.4
21	NB169	3.2 ± 0.0
22	NB185	4.2 ± 1.8
23	NB281	4.4 ± 0.4
24	NB289	25.1 ± 0.7

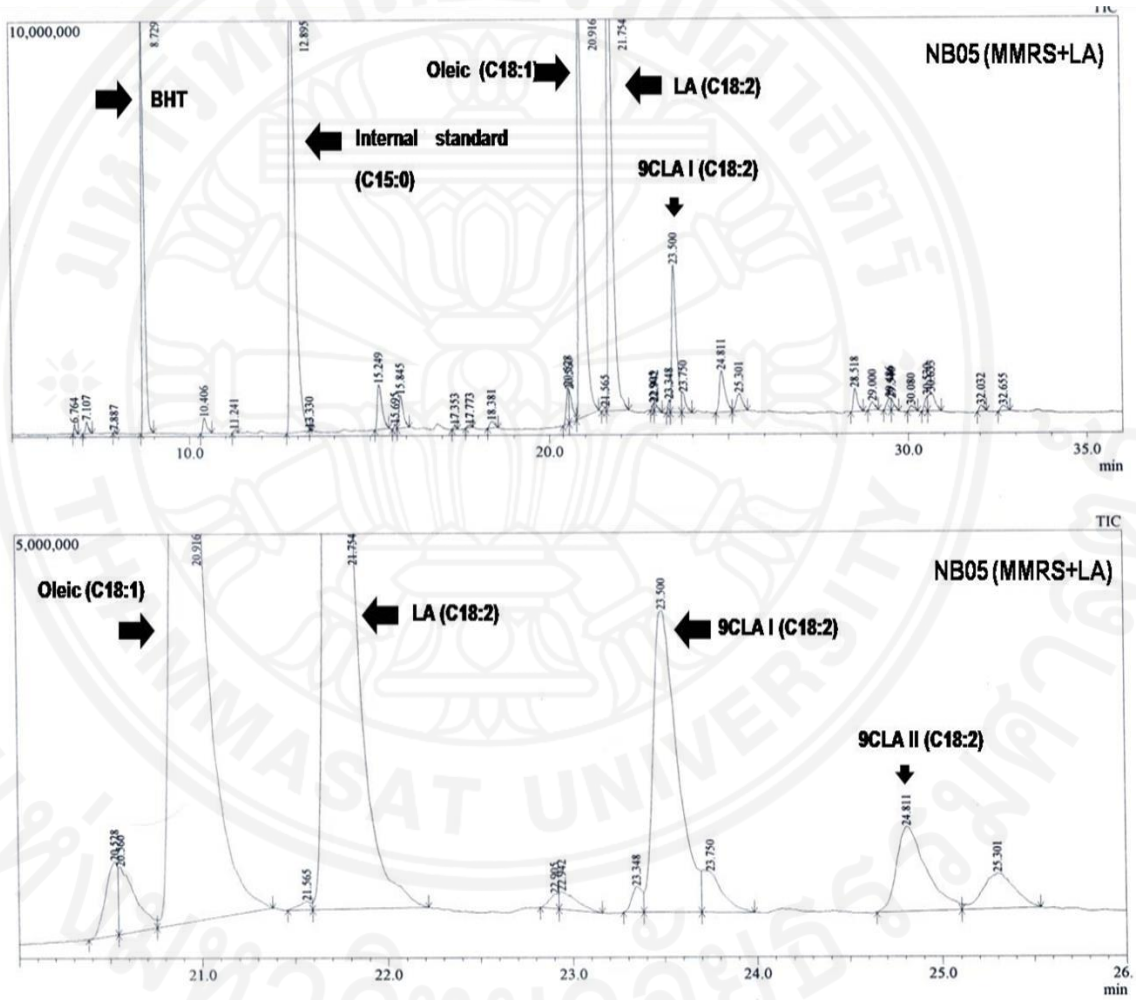
ตารางภาคผนวก ง-8 (ต่อ)

อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (เปอร์เซ็นต์) ของ *L.plantarum* แต่ละไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS และ MMRS+LA ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36 ชม.

ลำดับที่	ไอโซเลต	อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)
25	NB295	7.2 ± 0.3
26	NB311	10.1 ± 0.2
27	NB324	10.0 ± 0.0
28	NB404	3.4 ± 0.9
29	NB421	3.0 ± 0.1
30	NB17	4.5 ± 0.0
31	NB231	3.1 ± 0.0
32	NB384	5.3 ± 1.0
33	NB31	3.8 ± 0.3
34	NB406	5.4 ± 0.5
35	NB54	5.8 ± 0.2
36	NB191	5.2 ± 0.1
37	NB419	2.9 ± 0.0
38	NB93	3.6 ± 1.2
39	NB425	4.1 ± 0.1
40	NRIC1067	3.5 ± 0.1
41	NB403	4.3 ± 0.2
42	NB180	6.7 ± 0.5
43	NB182	4.5 ± 0.0
44	NB229	5.0 ± 0.2

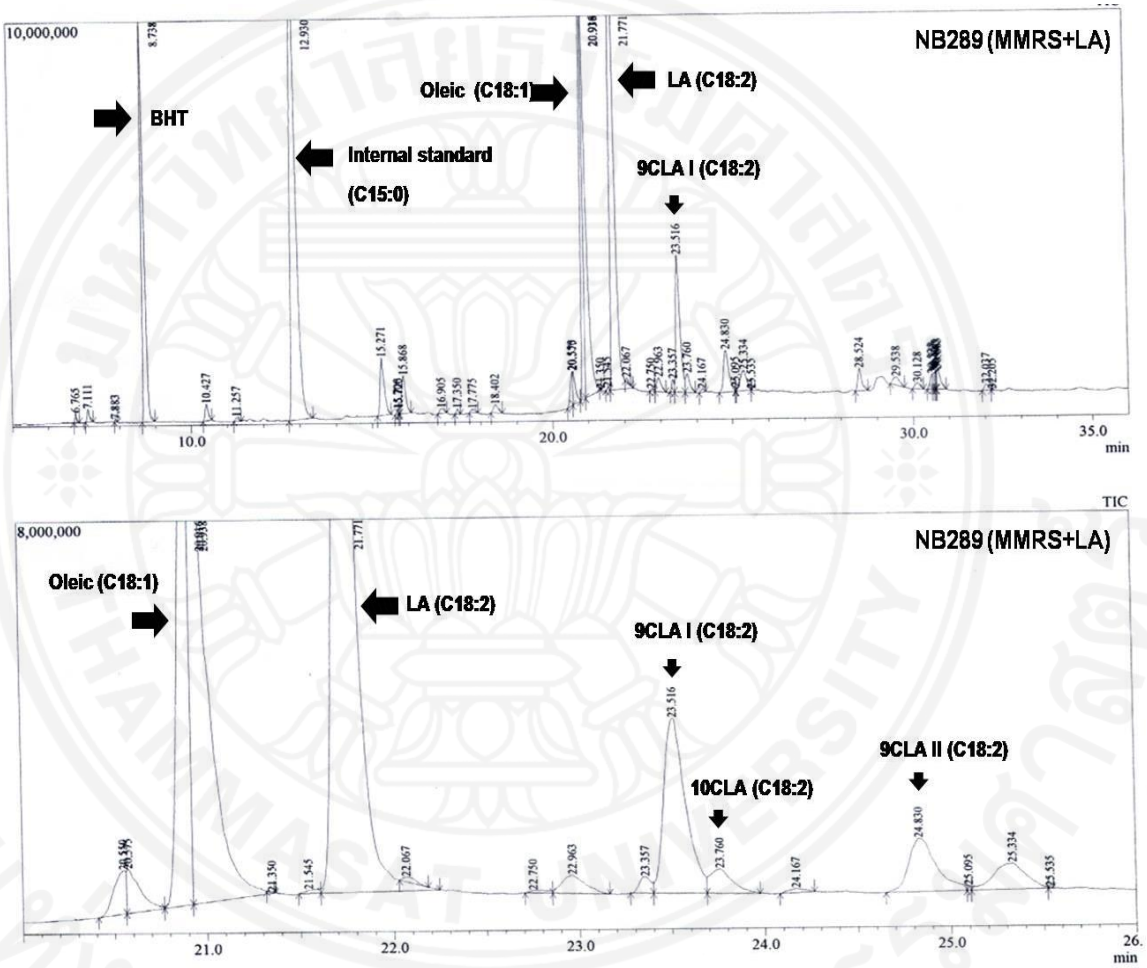
<u>ภาพภาคผนวก ง-1</u>

โครมาโตแกรมแสดงชนิดของกรดไขมันในน้ำหมักส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB05 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่มีการเติมสับสเตรท LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง



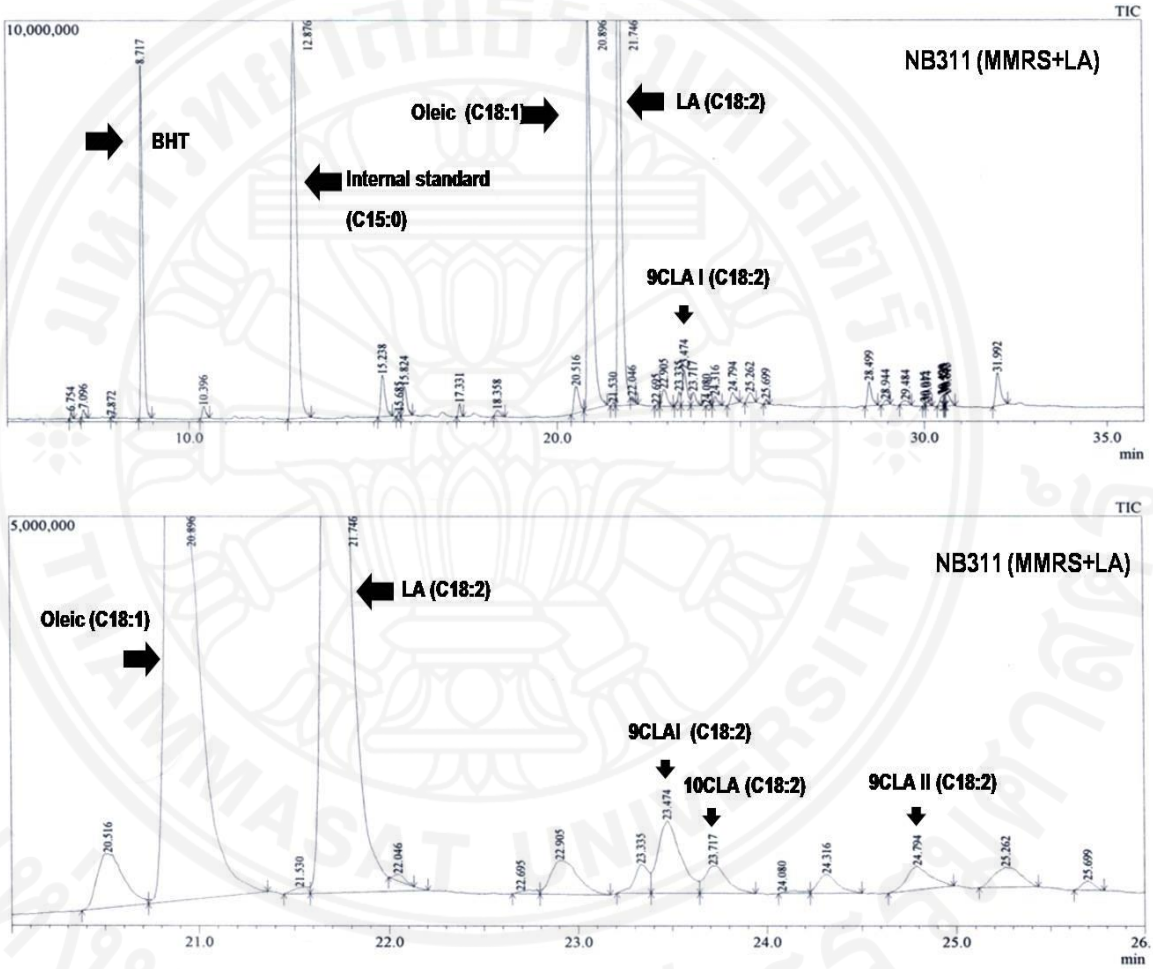
<u>ภาพภาคผนวก ง-2</u>

โครมาโตแกรมแสดงชนิดของกรดไขมันในน้ำหมักส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB289 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่มีการเติมสับสเตรท LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง



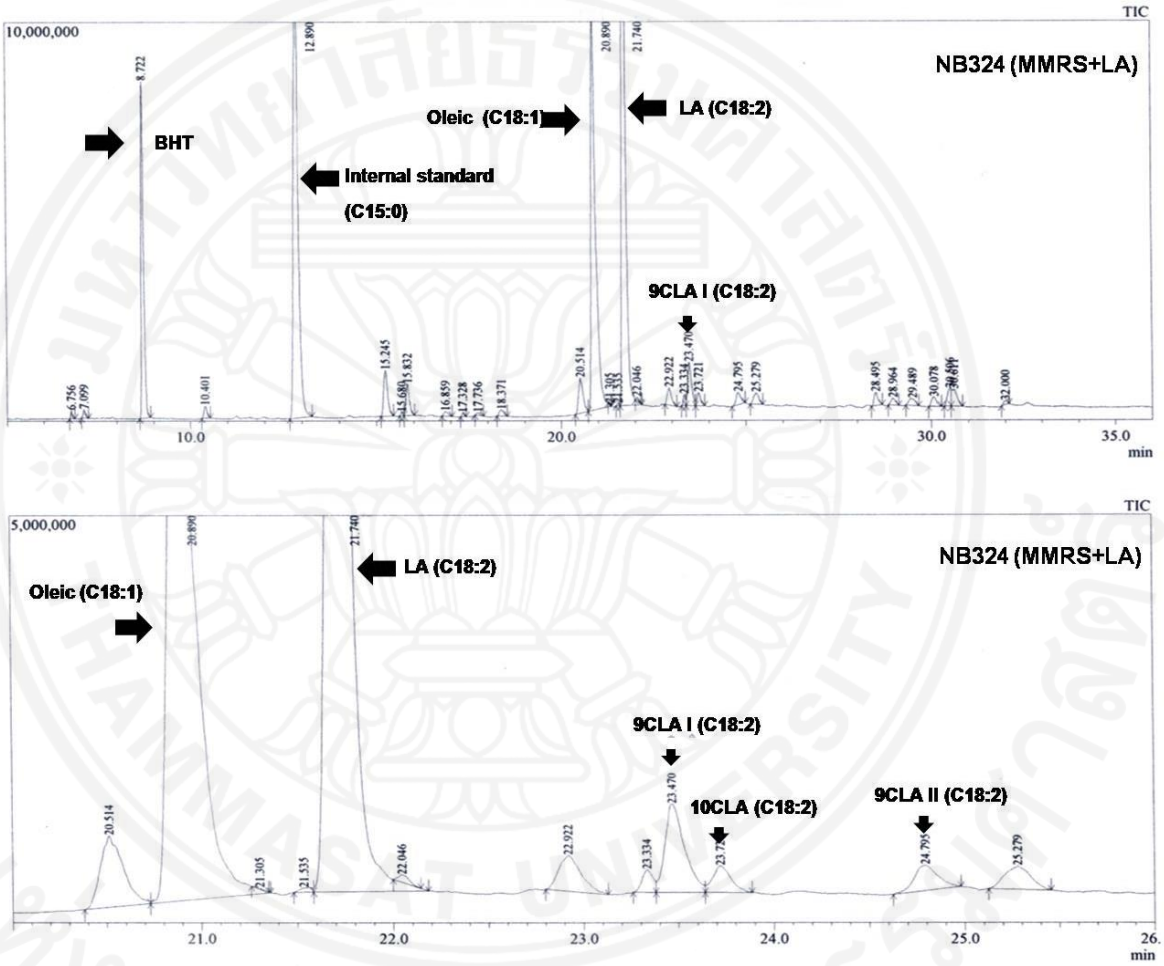
<u>ภาพภาคผนวก ง-3</u>

โครมาโตแกรมแสดงชนิดของกรดไขมันในน้ำหมักส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB311 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่มีการเติมสับสเตรท LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง



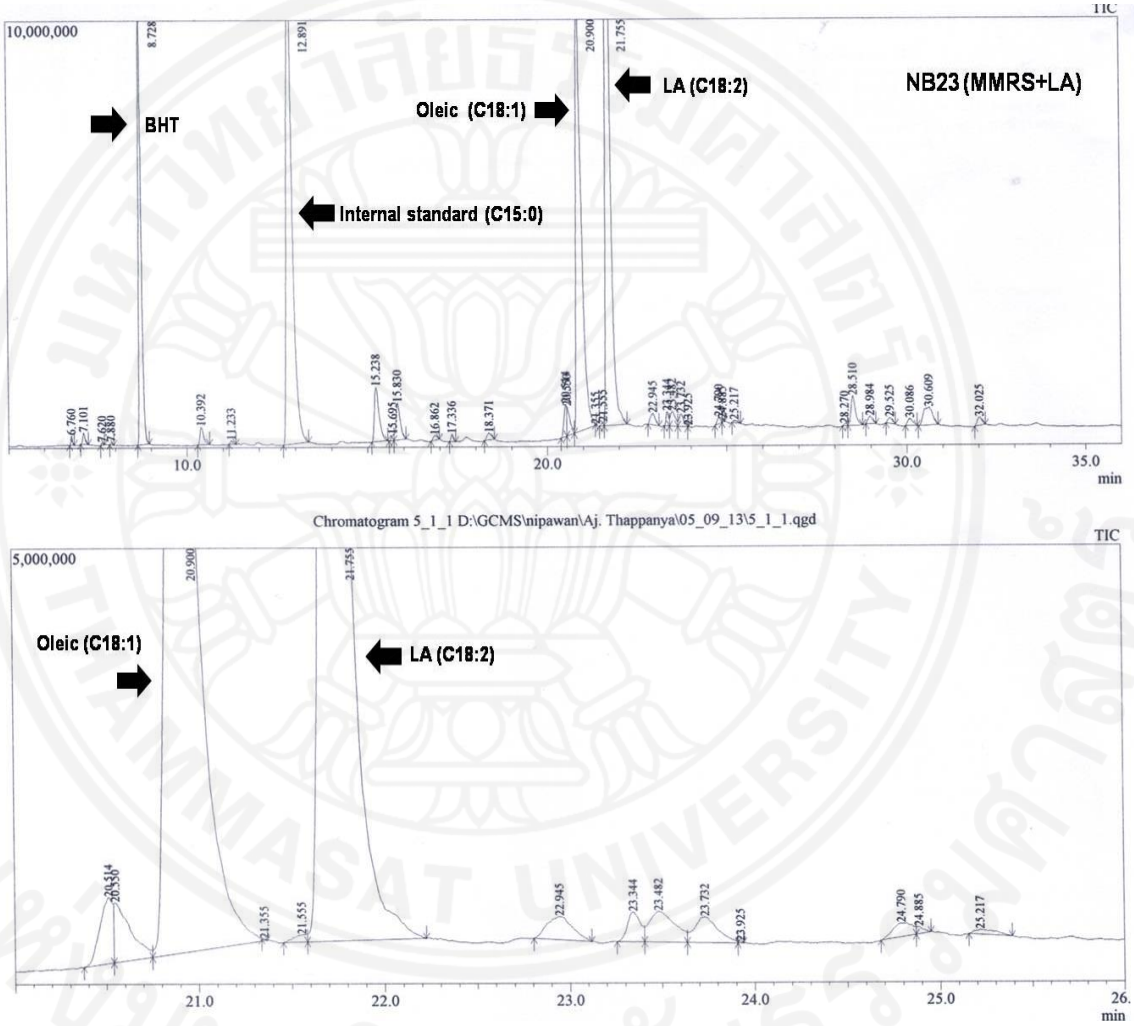
<u>ภาพภาคผนวก ง-4</u>

โครมาโตแกรมแสดงชนิดของกรดไขมันในน้ำหมักส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB324 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่มีการเติมสับสเตรท LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง



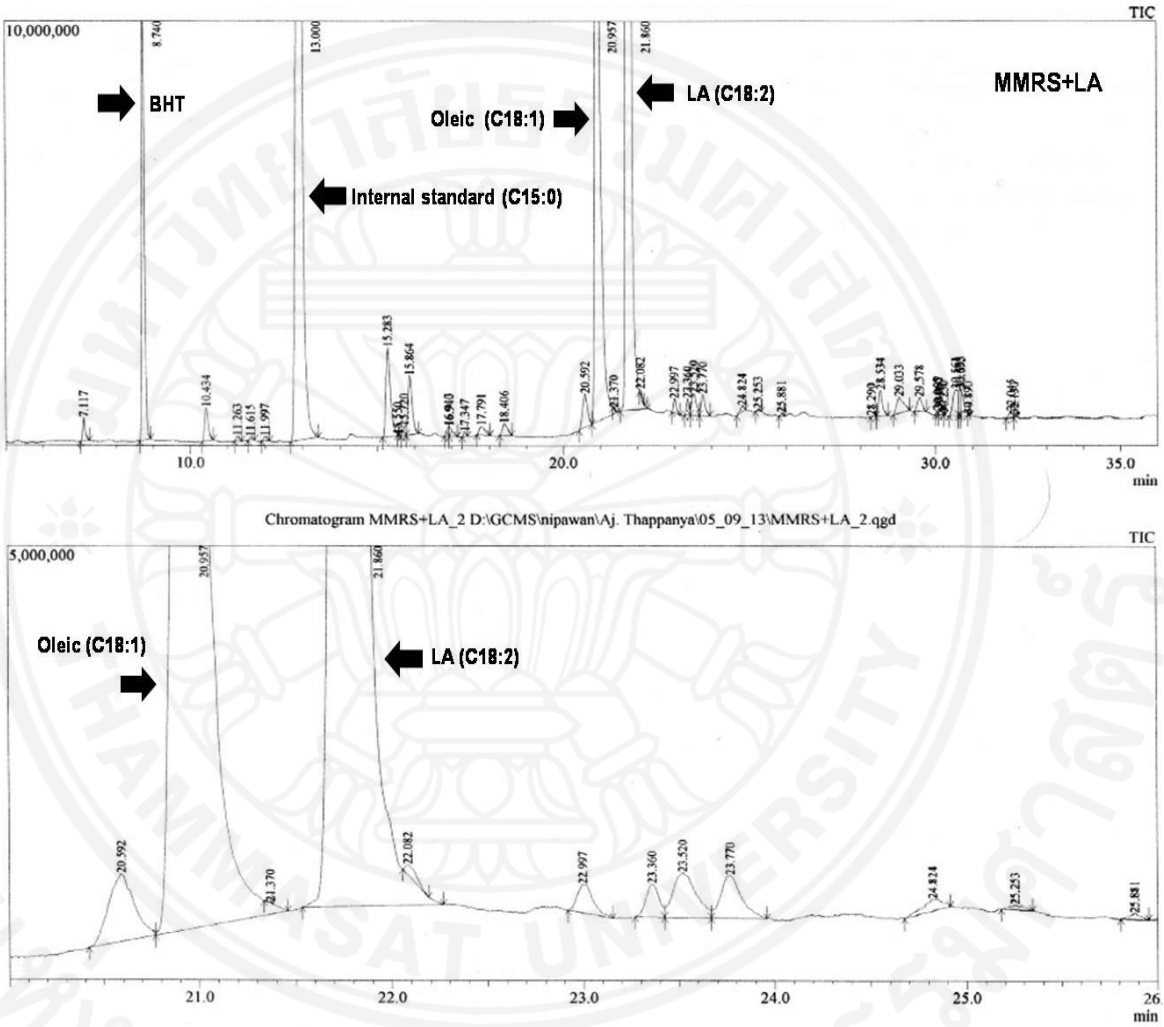
<u>ภาพภาคผนวก ง-5</u>

โครมาโตแกรมแสดงชนิดของกรดไขมันในน้ำหมักส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB23 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่มีการเติมสับสเตรท LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง



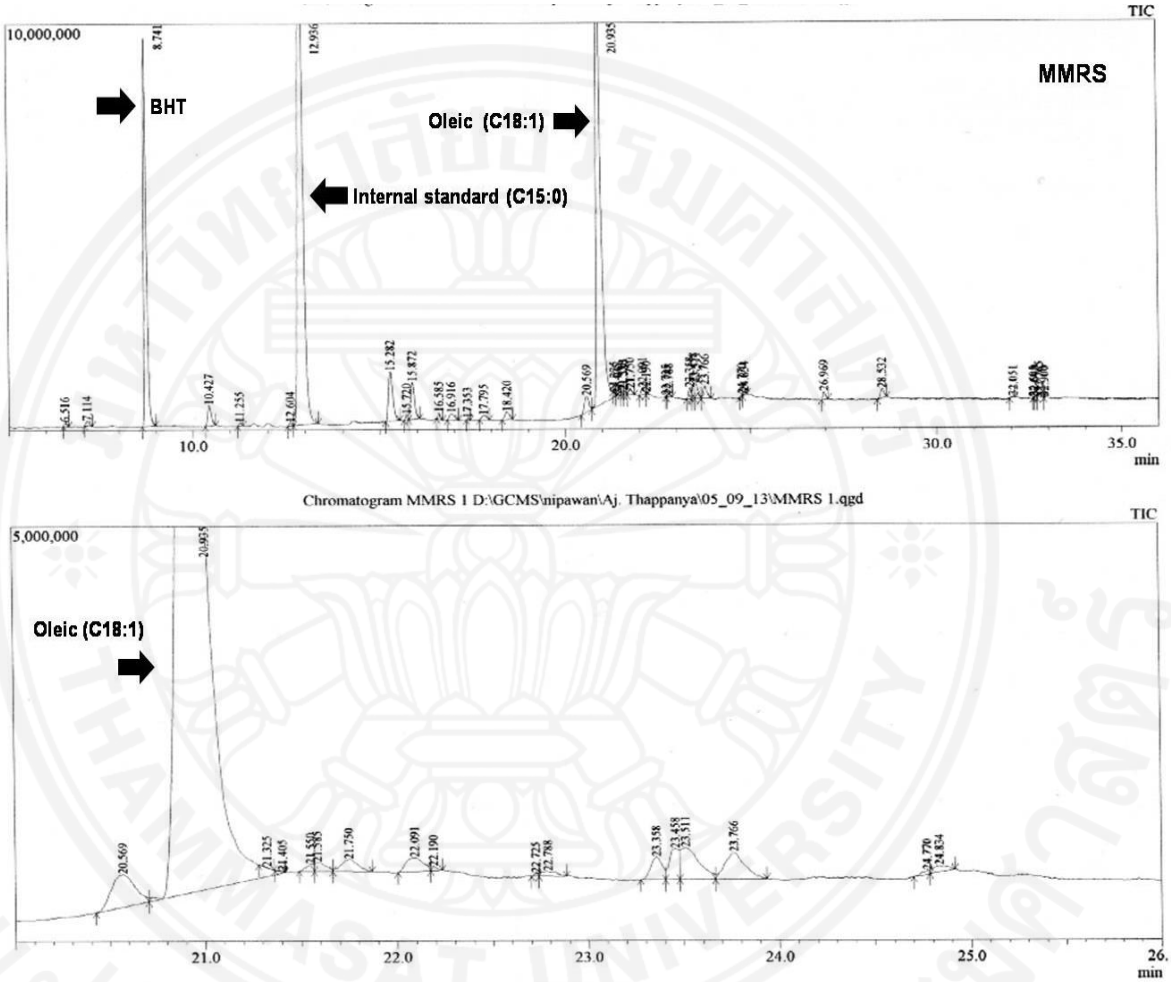
<u>ภาพภาคผนวก ง-6</u>

โครมาโตแกรมแสดงชนิดของกรดไขมันในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง (MMRS+LA) ที่มีการเติม LA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์



<u>ภาพภาคผนวก ง-7</u>

โครมาโตแกรมแสดงชนิดของกรดไขมันในอาหารเหลว MMRS



2. ข้อมูลจากการทดลองที่ II

ตารางภาคผนวก ง-9

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB05 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 48 ชม.

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	เวลา (ชม.)				
	0	12	24	36	48
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	0.1 ± 0.0	7.9 ± 0.3	9.5 ± 0.2	9.2 ± 0.6	9.1 ± 1.1
พีเอช	6.7 ± 0.1	3.9 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.4 ± 0.0
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	0.1 ± 0.0	2.3 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.3 ± 0.1
ปริมาณ LA ที่สะสมในน้ำหมัก (µg/mL)	1.7 ± 0.4	1.3 ± 0.2	0.1 ± 0.0	3.8 ± 0.6	0.9 ± 0.0
CLA ทั้งหมด (µg/mL)	6.3 ± 0.1	6.4 ± 0.0	6.8 ± 0.1	4.5 ± 0.1	3.4 ± 0.5
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (mg/g_{cell})	-	2.8 ± 0.1	2.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1	7.5 ± 0.2
ร้อยละของ CLA (% in TFA)	4.8 ± 0.2	5.6 ± 0.1	4.8 ± 0.5	4.5 ± 0.2	2.4 ± 0.9
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	-	-	-	-	-

ตารางภาคผนวก ง-9 (ต่อ)

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB05 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติม LA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 48 ชม.

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	เวลา (ชม.)				
	0	12	24	36	48
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	0.1 ± 0.0	7.6 ± 1.1	7.6 ± 1.1	8.6 ± 0.2	8.7 ± 0.1
พีเอช	6.7 ± 0.0	3.9 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.5 ± 0.0
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	0.1 ± 0.0	2.2 ± 0.0	2.7 ± 0.0	3.1 ± 0.0	2.2 ± 0.1
ปริมาณ LA ที่สะสมในน้ำหมัก (µg/mL)	129.6 ± 0.3	78.9 ± 0.6	37.4 ± 0.0	24.4 ± 0.1	19.0 ± 0.1
CLA ทั้งหมด (µg/mL)	7.7 ± 0.0	41.9 ± 0.3	67.7 ± 0.4	70.8 ± 0.3	62.5 ± 1.2
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (mg/g_{cell})	-	19.0 ± 0.2	25.1 ± 0.2	22.8 ± 0.3	28.4 ± 1.3
ร้อยละของ CLA (% in TFA)	2.7 ± 0.0	16.0 ± 0.3	30.2 ± 0.4	33.0 ± 0.2	32.1 ± 0.8
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	5.6 ± 0.0	33.4 ± 0.1	63.9 ± 0.1	73.8 ± 0.0	77.0 ± 0.5

ตารางภาคผนวก ง-9 (ต่อ)

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB05 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติม LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 48 ชม.

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	เวลา (ชม.)				
	0	12	24	36	48
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	0.1 ± 0.0	6.9 ± 1.4	8.2 ± 0.3	8.8 ± 0.2	8.1 ± 0.2
พีเอช	6.7 ± 0.0	3.9 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.4 ± 0.0
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	0.2 ± 0.0	2.0 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.1
ปริมาณ LA ที่สะสมในน้ำหมัก (μg/mL)	212.6 ± 0.2	157.8 ± 0.6	96.3 ± 0.0	64.1 ± 0.0	51.5 ± 0.3
CLA ทั้งหมด (μg/mL)	8.2 ± 0.1	40.8 ± 0.3	98.9 ± 0.2	108.8 ± 1.0	111.5 ± 0.5
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (mg/g_{cell})	-	20.2 ± 1.1	35.5 ± 1.1	42.1 ± 1.4	43.4 ± 1.2
ร้อยละของ CLA (% in TFA)	2.2 ± 0.0	11.5 ± 0.2	29.2 ± 0.5	34.3 ± 0.3	35.5 ± 0.5
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	3.8 ± 0.1	19.3 ± 0.1	49.9 ± 0.3	62.8 ± 0.6	67.8 ± 0.1

ตารางภาคผนวก ง-9 (ต่อ)

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB05 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติม LA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 48 ชม.

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	เวลา (ชม.)				
	0	12	24	36	48
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	0.1 ± 0.0	4.3 ± 0.0	6.6 ± 0.4	9.0 ± 0.5	8.2 ± 0.2
พีเอช	6.7 ± 0.0	4.3 ± 0.0	3.7 ± 0.0	3.5 ± 0.0	3.5 ± 0.0
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	0.1 ± 0.0	1.2 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.4 ± 0.1
ปริมาณ LA ที่สะสมในน้ำหมัก (μg/mL)	368.6 ± 0.7	298.5± 0.7	201.4 ± 0.3	153.2 ± 0.5	126.6± 0.5
CLA ทั้งหมด (μg/mL)	10.0 ± 0.2	11.4 ± 0.0	91.9 ± 0.7	140.1 ± 0.9	152.2± 2.6
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (mg/g_{cell})	-	9.7 ± 0.9	34.0 ± 1.5	53.5 ± 1.8	62.6 ± 1.6
ร้อยละของ CLA (% in TFA)	1.7 ± 0.0	2.1 ± 0.0	18.8 ± 0.2	30.2 ± 0.8	29.5 ± 1.0
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	2.7 ± 0.1	3.2 ± 0.0	29.2 ± 0.1	46.3 ± 0.2	54.0 ± 0.9

ตารางภาคผนวก ง-9 (ต่อ)

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB05 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติม LA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 48 ชม.

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	เวลา (ชม.)				
	0	12	24	36	48
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	7.8 ± 0.0	9.1 ± 0.5	8.1 ± 0.4
พีเอช	6.7 ± 0.0	6.4 ± 0.0	3.8 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	2.4 ± 0.0	2.5 ± 0.0	2.6 ± 0.1
ปริมาณ LA ที่สะสมในน้ำหมัก (µg/mL)	549.8 ± 0.7	521.9 ± 1.7	362.8 ± 0.9	313.9 ± 1.9	332.7 ± 2.0
CLA ทั้งหมด (µg/mL)	13.4 ± 0.3	12.1 ± 0.0	36.2 ± 0.6	71.1 ± 0.5	81.7 ± 1.9
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์(mg/g_{cell})	-	-	15.1 ± 0.2	28.4 ± 0.2	31.8 ± 1.5
ร้อยละของ CLA (% in TFA)	-	1.5 ± 0.0	5.4 ± 0.0	10.7 ± 0.3	10.6 ± 0.5
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	-	2.3 ± 0.1	6.5 ± 0.0	16.0 ± 0.0	18.8 ± 1.1

ตารางภาคผนวก ง-10

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 48 ชม.

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	เวลา (ชม.)				
	0	12	24	36	48
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	0.1 ± 0.0	7.6 ± 0.4	7.1 ± 1.2	5.4 ± 0.3	6.2 ± 0.8
พีเอช	6.7 ± 0.0	3.8 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	0.1 ± 0.0	2.7 ± 0.2	2.7 ± 0.0	2.7 ± 0.2	2.0 ± 0.1
ปริมาณ LA ที่สะสมในน้ำหมัก (µg/mL)	0	3.0 ± 0.5	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.0
CLA ทั้งหมด (µg/mL)	6.4 ± 0.1	6.3 ± 0.1	7.1 ± 0.2	5.2 ± 0.3	7.5 ± 0.4
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (mg/g_{cell})	-	2.4 ± 0.2	2.6 ± 0.1	1.9 ± 0.3	3.9 ± 0.3
ร้อยละของ CLA (% in TFA)	3.1 ± 0.1	4.0 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.8 ± 0.3	4.8 ± 0.5
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	-	67.6 ± 8.3	82.6 ± 3.3	80.6 ± 1.4	77.3 ± 0.2

ตารางภาคผนวก ง-10 (ต่อ)

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติม LA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 48 ชม.

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	เวลา (ชม.)				
	0	12	24	36	48
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	0.1 ± 0.0	7.1 ± 0.1	6.9 ± 1.0	5.4 ± 0.5	5.7 ± 0.1
พีเอช	6.7 ± 0.0	3.8 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.5 ± 0.0
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	0.1 ± 0.0	2.5 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.4 ± 0.2	2.1 ± 0.1
ปริมาณ LA ที่สะสมในน้ำหมัก (µg/mL)	127.6 ± 0.8	81.7 ± 0.3	49.9 ± 0.1	30.0 ± 0.1	28.0 ± 0.2
CLA ทั้งหมด (µg/mL)	7.0 ± 0.2	41.5 ± 0.4	68.7 ± 0.4	74.0 ± 0.2	73.4 ± 0.0
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์(mg/g_{cell})	-	16.6 ± 0.8	30.5 ± 1.9	31.5 ± 2.1	35.8 ± 1.0
ร้อยละของ CLA (% in TFA)	2.4 ± 0.1	16.3 ± 0.4	27.2 ± 0.2	28.8 ± 0.6	28.9 ± 0.9
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	5.1 ± 0.4	31.9 ± 0.4	57.2 ± 0.3	70.8 ± 0.1	71.0 ± 0.6

ตารางภาคผนวก ง-10 (ต่อ)

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติม LA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 48 ชม.

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	เวลา (ชม.)				
	0	12	24	36	48
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	0.1 ± 0.0	7.1 ± 0.2	6.0 ± 0.8	4.8 ± 0.5	6.0 ± 0.2
พีเอช	6.7 ± 0.0	3.8 ± 0.0	3.7 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	0.3 ± 0.0	2.7 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1
ปริมาณ LA ที่สะสมในน้ำหมัก (µg/mL)	216.1 ± 0.5	152.4 ± 0.2	97.3 ± 0.6	77.4 ± 0.4	73.8 ± 0.2
CLA ทั้งหมด (µg/mL)	8.2 ± 0.0	49.1 ± 0.3	99.5 ± 0.9	112.9 ± 3.2	105.7 ±1.1
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (mg/g_{cell})	-	18.3 ± 0.9	39.3 ± 1.9	53.3 ± 3.0	53.7 ± 3.7
ร้อยละของ CLA (% in TFA)	2.0 ± 0.0	13.1 ± 0.1	28.5 ± 0.3	36.4 ± 10.6	28.3 ± 1.2
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	3.7 ± 0.1	23.2 ± 0.0	49.4 ± 0.0	58.5 ± 0.6	58.7 ± 0.0

ตารางภาคผนวก ง-10 (ต่อ)

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติม LA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 48 ชม.

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	เวลา (ชม.)				
	0	12	24	36	48
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	0.1 ± 0.0	6.7 ± 0.5	5.8 ± 0.5	4.7 ± 0.2	6.1 ± 0.1
พีเอช	6.7 ± 0.0	3.9 ± 0.0	3.7 ± 0.0	3.7 ± 0.0	3.6 ± 0.0
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	0.3 ± 0.1	2.6 ± 0.2	2.8 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.1 ± 0.2
ปริมาณ LA ที่สะสมในน้ำหมัก (μg/mL)	331.5 ± 0.7	254.0 ± 2.9	194.1 ± 0.0	164.8 ± 0.9	159.0 ± 2.3
CLA ทั้งหมด (μg/mL)	9.6 ± 0.2	36.4 ± 0.5	112.9 ± 0.5	117.3 ± 1.5	104.4 ± 0.2
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (mg/g_{cell})	-	13.8 ± 1.0	40.3 ± 2.5	52.1 ± 4.2	49.7 ± 4.2
ร้อยละของ CLA (% in TFA)	1.8 ± 0.1	6.6 ± 0.2	18.8 ± 0.2	20.2 ± 0.6	19.4 ± 0.1
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	2.8 ± 0.1	11.0 ± 0.6	36.0 ± 0.0	41.1 ± 0.3	41.1 ± 0.8

ตารางภาคผนวก ง-10 (ต่อ)

ค่าที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB289 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MMRS ที่เติม LA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 48 ชม.

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	เวลา (ชม.)				
	0	12	24	36	48
ค่าการเจริญเติบโต (OD_{600})	0.1 ± 0.0	3.9 ± 0.2	5.3 ± 0.6	5.0 ± 0.4	6.9 ± 1.3
พีเอช	6.7 ± 0.0	4.4 ± 0.0	3.7 ± 0.0	3.7 ± 0.0	3.6 ± 0.0
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	0.2 ± 0.1	1.6 ± 0.2	2.6 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.2 ± 0.1
ปริมาณ LA ที่สะสมในน้ำหมัก (μg/mL)	524.7 ± 13.0	497.6 ± 1.1	366.3 ± 0.6	312.5 ± 1.0	319.9 ± 2.9
CLA ทั้งหมด (μg/mL)	11.6 ± 1.8	12.2 ± 0.1	60.0 ± 0.4	69.5 ± 0.3	64.8± 2.9
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (mg/g_{cell})	-	7.5 ± 0.9	23.2 ± 1.0	28.9 ± 1.3	29.9 ± 2.1
ร้อยละของ CLA (% in TFA)	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.0	6.8 ± 0.1	8.4 ± 0.2	8.3 ± 0.7
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	2.1 ± 0.0	2.4 ± 0.0	12.2 ± 0.0	18.2 ± 0.0	17.8 ± 0.0

ตารางภาคผนวก ง-11

การศึกษาความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก (LA) ต่อการผลิต CLA จาก *L. plantarum* NB05

LA / เวลา (ชม.)	ความเข้มข้น CLA (µg/mL)			
	9CLA-1	9CLA-2	10CLA	Total CLA
ไม่เติม LA				
0	3.0 ± 0.0	1.5 ± 0.0	1.9 ± 0.6	6.3 ± 0.1
12	2.7 ± 0.0	1.8 ± 0.0	2.1 ± 0.1	6.4 ± 0.0
24	2.6 ± 0.0	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.0	6.8 ± 0.1
36	1.5 ± 0.0	1.5 ± 0.0	1.5 ± 0.0	4.5 ± 0.1
48	1.3 ± 0.0	0.8 ± 0.4	1.2 ± 0.0	3.4 ± 0.5
0.5 มิลลิโมลาร์				
0	3.5 ± 0.0	1.7 ± 0.0	2.4 ± 0.0	7.7 ± 0.0
12	30.6 ± 0.1	8.4 ± 0.0	2.8 ± 0.0	41.9 ± 0.3
24	45.8 ± 0.4	19.1 ± 0.0	2.4 ± 0.0	67.7 ± 0.4
36	39.1 ± 0.3	28.9 ± 0.1	2.4 ± 0.0	70.8 ± 0.3
48	30.2 ± 0.6	30.6 ± 0.2	1.9 ± 0.0	62.6 ± 1.2
1.0 มิลลิโมลาร์				
0	3.7 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.5 ± 0.0	8.2 ± 0.1
12	29.2 ± 0.1	8.9 ± 0.2	3.0 ± 0.0	40.8 ± 0.3
24	70.5 ± 0.1	24.6 ± 0.0	3.2 ± 0.1	98.9 ± 0.2
36	67.8 ± 0.6	37.6 ± 0.3	3.0 ± 0.0	108.8 ± 1.0
48	63.5 ± 0.7	44.3 ± 0.1	2.6 ± 0.0	111.8 ± 0.5
2.0 มิลลิโมลาร์				
0	4.3 ± 0.1	2.5 ± 0.0	3.1 ± 0.0	10.0 ± 0.2
12	5.0 ± 0.0	3.6 ±0.0	3.0 ± 0.0	11.4 ± 0.0
24	66.2 ± 0.6	21.5 ± 0.1	3.6 ± 0.1	91.9 ± 0.7
36	95.8 ± 0.5	39.8 ± 0.4	3.8 ± 0.1	140.1 ± 0.9
48	94.8 ± 1.0	51.6 ±1.3	3.9 ± 0.1	152.2 ± 2.6

<u>ตารางภาคผนวก ง-11 (ต่อ)</u>

การศึกษาความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก (LA) ต่อการผลิต CLA จาก *L. plantarum* NB05

LA / เวลา (ชม.)	ความเข้มข้น CLA (µg/mL)			
	9CLA-1	9CLA-2	10CLA	Total CLA
4.0 มิลลิโมลาร์				
0	5.5 ± 0.1	3.7 ± 0.5	3.7 ± 0.1	13.4 ± 0.3
12	5.0 ± 0.0	3.4 ± 0.1	3.6 ± 0.0	12.1 ± 0.0
24	19.5 ± 0.1	13.6 ± 0.5	2.6 ± 0.0	36.2 ± 0.6
36	43.5 ± 0.3	24.1 ± 0.3	2.2 ± 0.1	71.1 ± 0.5
48	50.3 ± 0.6	30.3 ± 0.9	1.0 ± 0.0	81.7 ± 1.9

ตารางภาคผนวก ง-12

การศึกษาความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก (LA) ต่อการผลิต CLA จาก *L. plantarum* NB289

LA / เวลา (ชม.)	ความเข้มข้น CLA (µg/mL)			
	9CLA-1	9CLA-2	10CLA	Total CLA
ไม่เติม LA				
0	2.1 ± 0.0	1.8 ± 0.0	2.6 ± 0.0	6.4 ± 0.1
12	2.1 ± 0.1	1.7 ± 0.0	2.5 ± 0.1	6.4 ± 0.1
24	2.1 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.6 ± 0.0	7.1 ± 0.2
36	1.2 ± 0.1	2.3 ± 0.0	1.4 ± 0.0	5.2 ± 0.3
48	2.2 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.2 ± 0.0	7.5 ± 0.4
0.5 มิลลิโมลาร์				
0	2.6 ± 0.0	1.8 ± 0.0	2.8 ± 0.1	7.0 ± 0.2
12	27.7 ± 0.2	9.4 ± 0.0	3.5 ± 0.0	41.5 ± 0.4
24	42.1 ± 0.2	21.9 ± 0.1	3.9 ± 0.2	68.7 ± 0.4
36	37.2 ± 0.4	32.5 ± 0.4	3.3 ± 0.1	74.0 ± 0.2
48	35.9 ± 0.5	33.3 ± 0.5	3.1 ± 0.0	73.4 ± 0.0
1.0 มิลลิโมลาร์				
0	2.9 ± 0.1	2.1 ± 0.1	3.3 ± 0.0	8.3 ± 0.0
12	33.9 ± 0.2	11.6 ± 0.1	3.7 ± 0.0	49.1 ± 0.3
24	66.0 ± 0.0	29.1 ± 0.3	1.2 ± 0.1	99.5 ± 0.9
36	69.1 ± 2.0	40.7 ± 1.2	1.6 ± 0.0	112.9 ± 3.1
48	63.2 ± 0.2	40.0 ± 0.5	1.5 ± 0.0	105.7 ± 1.0
2.0 มิลลิโมลาร์				
0	3.4 ± 0.1	2.2 ± 0.0	3.1 ± 0.1	9.6± 0.2
12	21.5 ± 0.2	11.4 ± 0.1	3.9 ± 0.1	36.4 ± 0.5
24	75.8 ± 0.5	35.9 ± 0.2	1.01 ± 0.0	112.9 ± 1.5
36	74.4 ± 0.9	37.0 ± 0.9	1.0 ± 0.0	117.3 ± 1.5
48	35.4 ±0.1	65.3 ± 0.1	0.8 ± 0.0	104.4 ± 0.2

ตารางภาคผนวก ง-12 (ต่อ)

การศึกษาความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก (LA) ต่อการผลิต CLA จาก *L. plantarum* NB289

LA / เวลา (ชม.)	ความเข้มข้น CLA (μg/mL)			
	9CLA-1	9CLA-2	10CLA	Total CLA
4.0 มิลลิโมลาร์				
0	5.0 ± 0.1	3.3 ± 0.4	3.7 ± 0.0	11.6 ± 1.8
12	5.3 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.8 ± 0.0	12.2 ± 0.1
24	31.0 ± 0.2	22.7 ± 0.2	3.7 ± 0.0	60.0 ± 0.4
36	39.2 ± 0.1	25.2 ± 0.3	1.0 ± 0.0	69.4 ± 0.3
48	28.1 ± 4.1	32.8 ± 0.7	0.2 ± 0.1	64.8 ± 2.9

ตารางภาคผนวก ง-13

สัดส่วนกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS ที่แปรผันความเข้มข้น LA ของ *L. plantarum* NB05 ที่เวลาต่าง ๆ

LA / เวลา (ชม.)	สัดส่วนกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบเป็นองค์ประกอบ (%, w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1Δ9	C18:0	C18:1Δ9	C18:2 Δ9, 12	other
ไม่เติม LA							
0	1.6 ± 0.7	6.5 ± 2.5	3.4 ± 1.7	3.5 ± 1.1	26.9 ± 2.3	5.5 ± 3.2	52.6 ± 2.6
12	1.5 ± 0.2	6.6 ± 1.7	3.2 ± 0.7	5.7 ± 0.9	32.1 ± 1.0	5.9 ± 1.6	45.0 ± 1.6
24	1.3 ± 0.3	5.1 ± 1.3	2.9 ± 0.7	5.0 ± 1.6	29.5 ± 2.6	6.5 ± 3.5	49.7 ± 1.9
36	1.4 ± 0.3	6.0 ± 0.4	2.9 ± 0.8	4.3 ± 0.4	32.0 ± 2.8	6.1 ± 2.8	47.4 ± 2.8
48	1.3 ± 0.4	6.9 ± 1.6	2.8 ± 1.0	4.8 ± 1.4	31.3 ± 1.5	3.1 ± 0.9	49.7 ± 2.0
0.5 มิลลิโมลาร์							
0	1.1 ± 0.0	5.1 ± 0.3	2.5 ± 0.0	3.2 ± 0.1	21.6 ± 1.9	46.6 ± 1.3	19.7 ± 1.6
12	0.9 ± 0.0	3.7 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.9 ± 0.5	19.6 ± 1.7	45.3 ± 1.8	25.6 ± 1.9
24	0.8 ± 0.0	3.2 ± 0.4	1.3 ± 1.0	2.7 ± 0.2	22.4 ± 6.1	46.3 ± 1.1	23.3 ± 1.4
36	0.9 ± 0.0	3.9 ± 0.4	1.8 ± 0.1	2.8 ± 0.4	22.6 ± 1.0	41.8 ± 1.1	26.2 ± 6.0
48	0.6 ± 0.3	4.6 ± 0.3	1.8 ± 0.2	3.2 ± 0.2	13.0 ± 1.8	42.6 ± 0.2	34.2 ± 1.5
1.0 มิลลิโมลาร์							
0	0.9 ± 0.0	3.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.9 ± 0.5	17.6 ± 1.8	57.1 ± 0.8	17.2 ± 1.5
12	0.7 ± 0.0	3.0 ± 0.1	1.7 ± 0.1	2.1 ± 0.3	15.0 ± 1.0	53.4 ± 1.3	24.0 ± 1.3
24	0.6 ± 0.0	2.3 ± 0.1	1.5 ± 0.0	1.9 ± 0.2	16.9 ± 1.5	57.0 ± 1.2	19.8 ± 1.9
36	0.6 ± 0.0	3.1 ± 0.2	1.4 ± 0.0	2.0 ± 0.1	15.6 ± 1.0	54.1 ± 2.0	23.2 ± 1.4
48	0.6 ± 0.0	3.2 ± 0.4	1.4 ± 0.1	2.2 ± 0.5	15.9 ± 0.8	53.9 ± 2.9	22.8 ± 1.1
2.0 มิลลิโมลาร์							
0	0.7 ± 0.0	2.3 ± 0.0	1.7 ± 0.0	1.4 ± 0.1	14.2 ± 1.1	63.9 ± 1.2	15.8 ± 0.9
12	0.6 ± 0.0	2.5 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.3	14.0 ± 0.2	58.1 ± 2.6	21.5 ± 0.3
24	0.5 ± 0.0	2.0 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	13.3 ± 0.9	60.7 ± 3.2	21.0 ± 1.6
36	0.5 ± 0.0	2.4 ± 0.2	1.0 ± 0.0	1.7 ± 0.5	11.8 ± 0.7	60.8 ± 2.3	21.8 ± 0.4
48	0.5 ± 0.0	3.3 ± 0.4	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.3	12.4 ± 0.7	55.1 ± 3.1	26.0 ± 0.9

ตารางภาคผนวก ง-13 (ต่อ)

สัดส่วนปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS ที่แปรผันความเข้มข้น LA ของ *L. plantarum* NB05 ที่เวลาต่าง ๆ

LA / เวลา (ชม.)	สัดส่วนกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบเป็นองค์ประกอบ (%, w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1Δ9	C18:0	C18:1Δ9	C18:2 Δ9, 12	other
4.0 มิลลิโมลาร์							
0	0.6 ± 0.0	1.8 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.9 ± 0.1	11.6 ± 0.2	69.0 ± 0.6	14.7 ± 0.9
12	0.4 ± 0.0	2.3 ± 0.1	1.5 ± 0.0	1.2 ± 0.2	11.9 ± 0.3	64.7 ± 0.7	18.0 ± 0.9
24	0.4 ± 0.0	2.0 ± 0.3	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.2	11.7 ± 0.5	60.7 ± 1.7	22.9 ± 0.8
36	0.4 ± 0.0	2.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.0	10.3 ± 0.1	58.4 ± 2.3	26.9 ± 0.3
48	0.3 ± 0.0	3.0 ± 1.4	0.9 ± 0.0	1.1 ± 0.3	9.9 ± 6.8	57.8 ± 3.1	27.0 ± 0.2

ตารางภาคผนวก ง-14

สัดส่วนกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS ที่แปรผันความเข้มข้น LA ของ *L. plantarum* NB289 ที่เวลาต่าง ๆ

LA / เวลา (ชม.)	สัดส่วนกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบเป็นองค์ประกอบ (%, w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1Δ9	C18:0	C18:1Δ9	C18:2 Δ9, 12	other
ไม่เติม LA							
0	0	7.0 ± 1.1	2.0 ± 0.8	3.1 ± 0.2	39.9 ± 1.5	2.6 ± 0.9	45.4 ± 0.4
12	1.0 ± 0.4	6.6 ± 0.5	2.7 ± 0.2	4.0 ± 0.3	29.0 ± 1.9	6.4 ± 0.1	50.3 ± 2.7
24	0.9 ± 0.0	10.2 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.9 ± 0.8	20.7 ± 2.9	3.1 ± 0.9	59.9 ± 1.8
36	1.2 ± 0.4	8.8 ± 0.6	2.8 ± 0.6	4.8 ± 0.3	35.3 ± 1.5	3.4 ± 0.4	43.7 ± 1.7
48	0.8 ± 0.0	7.4 ± 0.6	1.7 ± 0.4	3.5 ± 0.8	28.8 ± 0.4	3.1 ± 1.0	54.6 ± 0.9
0.5 มิลลิโมลาร์							
0	0.2 ± 0.0	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.7 ± 0.0	7.8 ± 0.4	39.4 ± 2.4	50.2 ± 1.3
12	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.8 ± 0.0	6.5 ± 0.3	44.5 ± 0.4	47.1 ± 0.3
24	1.0 ± 0.1	5.3 ± 0.4	2.0 ± 0.1	2.9 ± 0.4	27.6 ± 0.5	38.9 ± 1.0	22.3 ± 1.1
36	0.7 ± 0.1	4.9 ± 0.4	1.6 ± 0.1	2.9 ± 0.5	21.3 ± 2.3	38.8 ± 2.1	29.7 ± 1.6
48	0.6 ± 0.0	3.8 ± 0.0	1.6 ± 0.0	3.2 ± 0.7	23.5 ± 0.3	41.7 ± 1.6	25.7 ± 8.0
1.0 มิลลิโมลาร์							
0	0.5 ± 0.0	2.2 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.3 ± 0.2	14.2 ± 1.1	47.3 ± 4.7	32.8 ± 1.4
12	0.6 ± 0.0	3.5 ± 0.2	1.4 ± 0.1	2.0 ± 0.1	17.9 ± 1.4	49.0 ± 1.2	25.6 ± 1.0
24	0.8 ± 0.0	4.7 ± 0.2	1.5 ± 0.1	2.0 ± 0.1	15.7 ± 1.3	48.2 ± 0.7	27.2 ± 2.9
36	0.5 ± 0.0	3.9 ± 0.8	1.6 ± 0.5	1.9 ± 0.4	15.7 ± 0.6	49.0 ± 3.2	27.5 ± 0.8
48	0.5 ± 0.0	3.9 ± 0.7	1.0 ± 0.0	2.5 ± 0.6	16.7 ± 0.9	51.2 ± 1.6	24.2 ± 0.5
2.0 มิลลิโมลาร์							
0	0.7 ± 0.0	2.9 ± 0.0	1.6 ± 0.0	1.5 ± 0.2	14.8 ± 1.7	60.9 ± 1.2	17.7 ± 1.4
12	0.5 ± 0.1	4.1 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.5	13.8 ± 0.9	53.4 ± 0.8	25.4 ± 0.3
24	0.6 ± 0.0	3.8 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.1	11.7 ± 0.9	50.8 ± 2.0	30.2 ± 0.1
36	0.4 ± 0.0	2.8 ± 0.0	1.4 ± 0.3	1.4 ± 0.2	11.9 ± 0.6	49.1 ± 1.0	33.1 ± 0.3
48	0.4 ± 0.0	5.4 ± 0.3	1.1 ± 0.5	1.6 ± 0.5	12.7 ± 1.8	51.8 ± 2.9	27.1 ± 0.2

ตารางภาคผนวก ง-14 (ต่อ)

สัดส่วนกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS ที่แปรผันความเข้มข้น LA ของ *L. plantarum* NB289 ที่เวลาต่าง ๆ

LA / เวลา (ชม.)	สัดส่วนกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่พบเป็นองค์ประกอบ (%, w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1Δ9	C18:0	C18:1Δ9	C18:2 Δ9, 12	other
4.0 มิลลิโมลาร์							
0	0.5 ± 0.1	2.2 ± 0.0	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1	15.9 ± 0.7	62.7 ± 5.1	16.4 ± 0.9
12	0.8 ± 0.0	5.1 ± 0.2	1.4 ± 0.2	0.8 ± 0.0	11.4 ± 0.4	56.4 ± 1.0	24.0 ± 1.1
24	0.5 ± 0.0	3.4 ± 0.0	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2	10.0 ± 0.0	50.2 ± 2.8	33.6 ± 0.6
36	0.4 ± 0.0	3.9 ± 0.7	1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.3	9.5 ± 0.2	48.5 ± 1.5	35.5 ± 0.2
48	0.3 ± 0.0	4.7 ± 0.3	0.9 ± 0.0	1.1 ± 0.3	9.6 ± 0.5	52.4 ± 2.2	31.0 ± 3.9

ตารางภาคผนวก ง-15

ปริมาณผลิตภัณฑ์ไอโซเมอร์ของ CLA ที่ผลิตได้ (% in total CLA) ของ *L.plantarum* NB05

ความเข้มข้นของ LA (มิลลิโมลาร์) / เวลา (ชม.)	ปริมาณผลิตภัณฑ์ CLA ที่ผลิตได้ (% in total CLA)				CLA ทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
	9CLA-1	9CLA-2	10CLA	CLA อื่น ๆ	
ไม่เติม LA					
0	46.6 ± 0.4	23.3 ± 0.3	30.1 ± 0.7	0	6.3 ± 0.1
12	41.4 ± 0.2	27.6 ± 0.3	31.0 ± 0.4	0	6.4 ± 0.0
24	41.6 ± 0.1	28.0 ± 1.5	30.4 ± 2.4	0	6.8 ± 0.1
36	31.8 ± 0.6	37.0 ± 1.7	30.9 ± 2.1	0.4 ± 0.0	4.5 ± 0.1
48	36.9 ± 0.9	27.5 ± 1.7	34.8 ± 2.3	0.8 ± 0.0	3.4 ± 0.5
0.5 มิลลิโมลาร์					
0	44.9 ± 0.7	22.3 ± 0.7	31.8 ± 0.7	1.0 ± 0.1	7.7 ± 0.0
12	63.7 ± 1.9	30.5 ± 0.4	5.5 ± 0.4	0.3 ± 0.0	41.9 ± 0.3
24	64.4 ± 0.7	31.8 ± 0.8	3.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0	67.7 ± 0.4
36	51.8 ± 0.5	44.7 ± 0.6	3.1 ± 0.1	0.5 ± 0.0	70.8 ± 0.3
48	48.3 ± 0.9	47.8 ± 1.0	2.6 ± 0.1	1.3 ± 0.2	62.6 ± 1.2
1.0 มิลลิโมลาร์					
0	44.4 ± 0.3	24.6 ± 0.4	31.0 ± 0.8	0	8.2 ± 0.1
12	60.1 ± 4.5	34.2 ± 5.3	5.7 ± 0.8	0	40.8 ± 0.3
24	67.5 ± 1.5	29.1 ± 1.6	3.0 ± 0.2	0.5 ± 0.0	98.9 ± 0.2
36	54.8 ± 0.7	42.3 ± 0.6	2.4 ± 00.1	0.5 ± 0.0	108.8 ± 1.0
48	55.8 ± 1.0	41.1 ± 1.1	2.1 ± 0.0	1.0 ± 0.2	111.8 ± 0.5
2.0 มิลลิโมลาร์					
0	40.3 ± 4.4	26.8 ± 1.6	32.9 ± 2.9	0	10.0 ± 0.2
12	40.9 ± 0.7	41.0 ± 3.5	18.2 ± 2.9	0	11.4 ± 0.0
24	65.8 ± 2.3	30.3 ± 2.5	3.4 ± 0.2	0.4 ± 0.0	91.9 ± 0.7
36	60.3 ± 3.0	36.8 ± 3.2	2.4 ± 0.1	0.5 ± 0.0	140.1 ± 0.9
48	60.5 ± 0.5	36.3 ± 0.9	2.3 ± 0.1	0.9 ± 0.0	152.2 ± 2.6
4.0 มิลลิโมลาร์					
0	41.4 ± 0.9	28.6 ± 0.5	28.9 ± 0.7	1.1 ± 0.1	13.4 ± 0.3
12	44.8 ± 2.9	19.6 ± 1.5	32.1 ± 0.6	3.5 ± 0.1	12.1 ± 0.0
24	46.4 ± 3.7	47.6 ± 2.1	5.1 ± 0.5	0.9 ± 0.0	36.2 ± 0.6
36	58.2 ± 6.1	38.0 ± 5.9	2.5 ± 0.2	1.3 ± 0.2	71.1 ± 0.5
48	55.0 ± 6.9	41.0 ± 4.1	1.6 ± 0.4	2.4 ± 0.4	81.7 ± 1.9

ตารางภาคผนวก ง-16

ปริมาณผลิตภัณฑ์ไอโซเมอร์ของ CLA ที่ผลิตได้ (% in total CLA) ของ *L.plantarum* NB289

ความเข้มข้นของ LA (มิลลิโมลาร์) / เวลา (ชม.)	ปริมาณผลิตภัณฑ์ CLA ที่ผลิตได้ (% in total CLA)				CLA ทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
	9CLA-1	9CLA-2	10CLA	CLA อื่น ๆ	
ไม่เติม LA					
0	34.5 ± 3.6	27.4 ± 0.9	38.1 ± 3.1	0	6.4 ± 0.1
12	32.9 ± 1.4	28.6 ± 2.0	38.5 ± 1.6	0	6.4 ± 0.1
24	28.1 ± 3.0	32.2 ± 2.1	39.7 ± 1.9	0	7.1 ± 0.2
36	20.4 ± 6.4	52.1 ± 4.2	27.5 ± 2.9	0	5.2 ± 0.3
48	23.9 ± 3.1	47.7 ± 4.5	26.4 ± 4.0	1.9 ± 0.3	7.5 ± 0.4
0.5 มิลลิโมลาร์					
0	40.8 ± 4.8	27.5 ± 3.8	39.0 ± 1.9	0	7.0 ± 0.2
12	75.4 ± 0.9	19.6 ± 0.3	15.1 ± 1.0	43.8 ± 5.9	41.5 ± 0.4
24	55.3 ± 1.9	40.2 ± 0.2	4.5 ± 0.8	0	68.7 ± 0.4
36	49.0 ± 1.4	46.0 ± 1.7	3.7 ± 0.2	1.3 ± 0.1	74.0 ± 0.2
48	49.4 ± 0.7	45.9 ± 0.8	3.3 ± 0.3	1.4 ± 0.1	73.4 ± 0.0
1.0 มิลลิโมลาร์					
0	47.6 ± 4.3	24.0 ± 2.4	37.3 ± 4.1	0	8.3 ± 0.0
12	48.0 ± 1.6	46.9 ± 1.6	4.9 ± 0.2	0.3 ± 0.0	49.1 ± 0.3
24	57.3 ± 1.0	39.9 ± 1.2	2.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0	99.5 ± 0.9
36	60.6 ± 0.6	36.7 ± 0.7	1.5 ± 0.3	1.3 ± 0.1	112.9 ± 3.1
48	59.9 ± 0.6	36.7 ± 0.2	2.0 ± 0.5	1.3 ± 0.1	105.7 ± 1.0
2.0 มิลลิโมลาร์					
0	41.6 ± 3.4	21.9 ± 2.9	36.5 ± 3.4	0	9.6± 0.2
12	34.5 ± 0.3	61.2 ± 0.8	4.3 ± 0.5	0.1 ± 0.0	36.4 ± 0.5
24	50.6 ± 3.2	47.3 ± 3.1	0.8 ± 0.0	1.3 ± 0.0	112.9 ± 1.5
36	60.8 ± 0.6	35.9 ± 1.0	0.9 ± 0.0	2.4 ± 0.1	117.3 ± 1.5
48	21.2 ± 2.4	62.7 ± 2.1	13.5 ± 0.5	2.6 ± 0.2	104.4 ± 0.2
4.0 มิลลิโมลาร์					
0	40.6 ± 6.6	26.1 ± 5.7	33.4 ± 0.9	0	11.6 ± 1.8
12	42.4 ± 2.4	27.2 ± 3.9	30.4 ± 2.5	0	12.2 ± 0.1
24	36.6 ± 1.9	59.8 ± 2.1	2.8 ± 0.2	0.8 ± 0.0	60.0 ± 0.4
36	58.9 ± 1.5	36.7 ± 1.4	1.6 ± 0.1	2.8 ± 0.3	69.4 ± 0.3
48	44.9 ± 3.4	50.2 ± 1.8	1.6 ± 0.6	3.3 ± 0.2	64.8 ± 2.9

ตารางภาคผนวก ง - 17

อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์แต่ละไอโซเมอร์ของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB05

ความเข้มข้นของ LA (มิลลิโมลาร์) / เวลา (ชม.)	อัตราการเปลี่ยน LA เป็น CLA (%)			
	9CLA-1	9CLA-2	10CLA	Total CLA
ไม่เติม LA				
12	-	-	-	-
24	-	-	-	-
36	-	-	-	-
48	-	-	-	-
0.5 มิลลิโมลาร์				
12	27.7 ± 0.5	7.5 ± 0.1	3.4 ± 0.1	33.4 ± 0.1
24	55.1 ± 0.2	31.5 ± 0.1	6.1 ± 0.0	63.9 ± 0.1
36	61.6 ± 0.1	52.4 ± 0.0	8.7 ± 0.0	73.8 ± 0.0
48	61.8 ± 0.5	61.2 ± 0.9	9.5 ± 0.4	77.0 ± 0.5
1.0 มิลลิโมลาร์				
12	15.3 ± 0.1	3.9 ± 0.2	1.9 ± 0.0	19.3 ± 0.1
24	42.5 ± 0.1	18.2 ± 0.3	3.3 ± 0.1	49.9 ± 0.3
36	52.3 ± 0.1	34.8 ± 0.4	4.2 ± 0.1	62.8 ± 0.6
48	54.3 ± 0.3	45.8 ± 0.2	4.8 ± 0.0	67.8 ± 0.1
2.0 มิลลิโมลาร์				
12	1.4 ± 0.0	0.9 ± 0.0	1.0 ± 0.0	3.2 ± 0.0
24	24.2 ± 0.1	7.0 ± 0.0	1.6 ± 0.1	29.2 ± 0.1
36	38.2 ± 0.1	17.6 ± 0.2	2.4 ± 0.1	46.3 ± 0.2
48	42.5 ± 0.6	28.0 ± 1.2	3.0 ± 0.1	54.0 ± 0.9
4.0 มิลลิโมลาร์				
12	1.0 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	2.3 ± 0.1
24	4.4 ± 0.1	1.5 ± 0.0	0.7 ± 0.0	6.5 ± 0.0
36	11.4 ± 0.0	4.8 ± 0.1	0.7 ± 0.0	16.0 ± 0.0
48	12.6 ± 0.1	7.8 ± 0.6	0.3 ± 0.0	18.8 ± 1.1

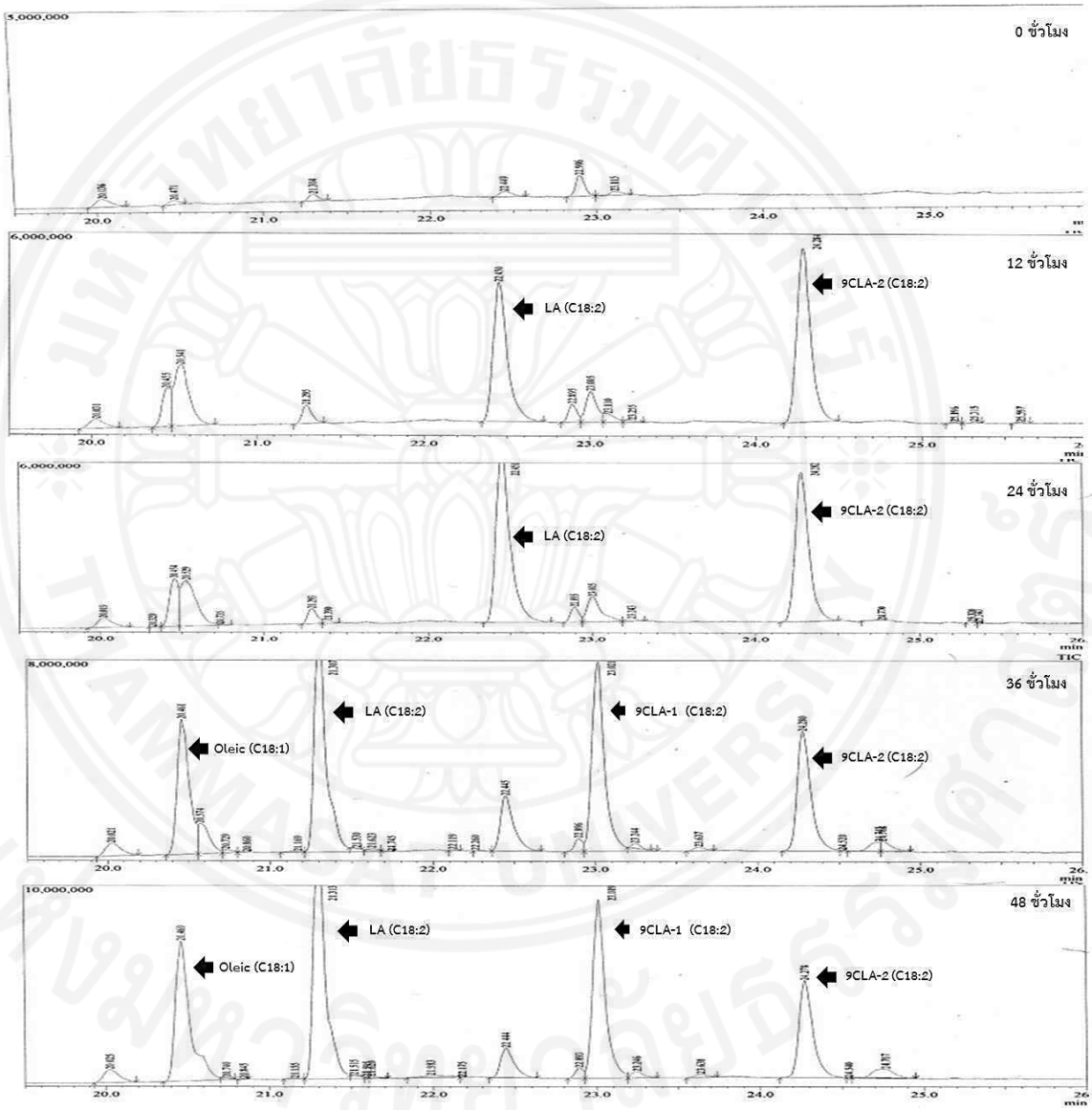
ตารางภาคผนวก ง - 18

อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์แต่ละไอโซเมอร์ของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB289

ความเข้มข้นของ LA (มิลลิโมลาร์) / เวลา (ชม.)	อัตราการเปลี่ยน LA เป็น CLA (%)			
	9CLA-1	9CLA-2	10CLA	Total CLA
ไม่เติม LA				
12	-	-	-	-
24	-	-	-	-
36	-	-	-	-
48	-	-	-	-
0.5 มิลลิโมลาร์				
12	25.1 ± 0.3	8.4 ± 0.0	4.2 ± 0.0	31.9 ± 0.5
24	46.1 ± 0.1	29.5 ± 0.3	7.2 ± 0.8	57.2 ± 0.3
36	54.8 ± 0.2	51.2 ± 0.6	9.7 ± 0.1	70.8 ± 0.1
48	54.4 ± 0.1	54.0 ± 0.5	10.6 ± 0.1	71.0 ± 0.6
1.0 มิลลิโมลาร์				
12	17.8 ± 0.0	5.2 ± 0.1	2.4 ± 0.0	23.2 ± 0.0
24	40.6 ± 0.6	21.6 ± 0.4	1.2 ± 0.2	49.4 ± 0.0
36	46.4 ± 0.3	34.4 ± 0.0	1.9 ± 0.0	58.5 ± 0.6
48	45.9 ± 0.7	35.1 ± 1.2	2.0 ± 0.0	58.7 ± 0.0
2.0 มิลลิโมลาร์				
12	7.3 ± 0.3	2.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	11.0 ± 0.6
24	28.0 ± 0.0	13.8 ± 0.1	0.5 ± 0.0	36.0 ± 0.0
36	31.4 ± 0.5	19.0 ± 0.4	0.6 ± 0.0	41.1 ± 0.3
48	11.6 ± 0.5	29.9 ± 0.1	9.2 ± 0.2	41.1 ± 0.8
4.0 มิลลิโมลาร์				
12	1.1 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.8 ± 0.0	2.4 ± 0.0
24	7.8 ± 0.0	3.9 ± 0.0	1.0 ± 0.0	12.2 ± 0.0
36	11.6 ± 0.1	7.5 ± 0.1	0.3 ± 0.0	18.2 ± 0.0
48	8.1 ± 1.2	9.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	17.8 ± 0.9

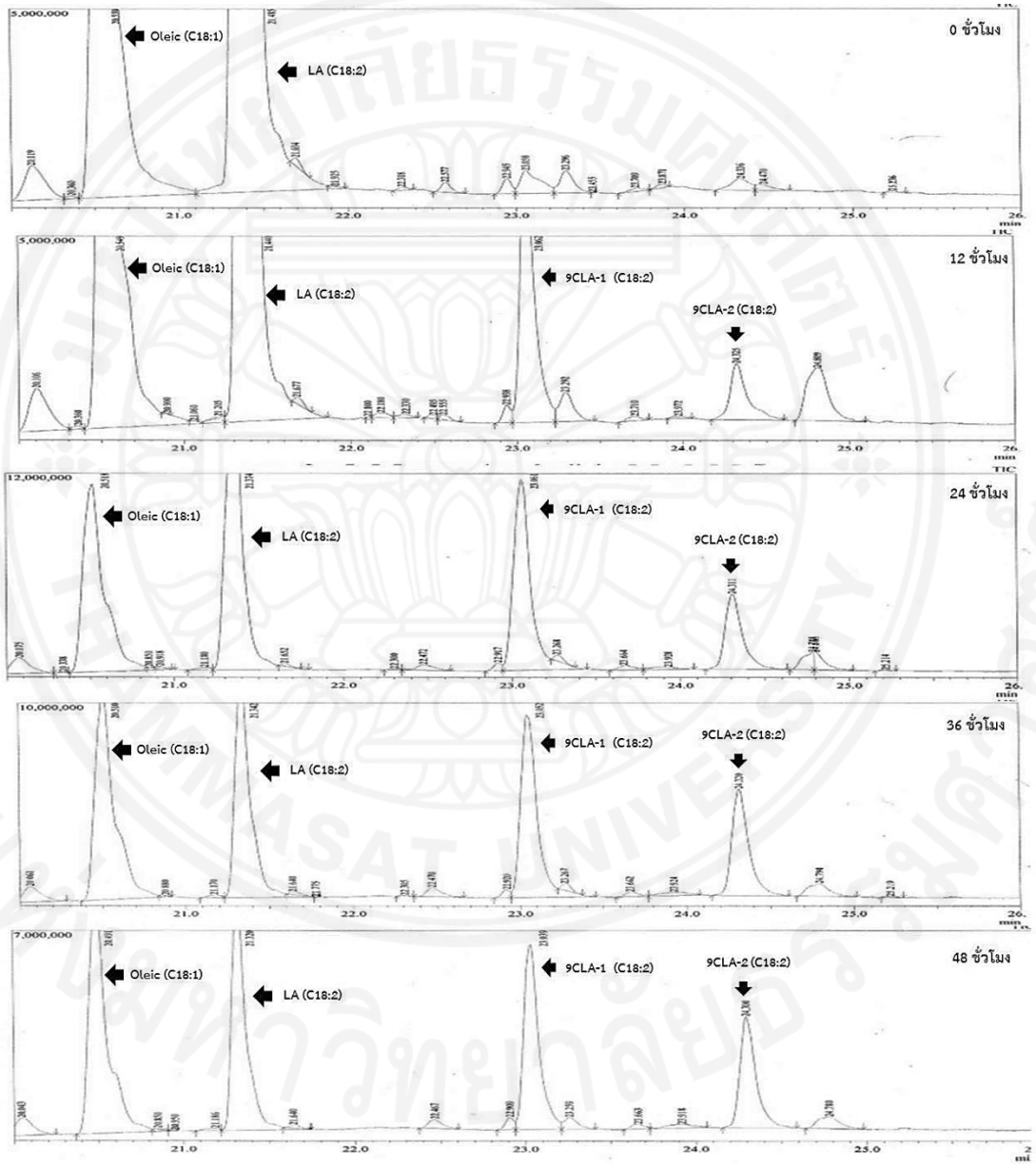
<u>ภาพภาคผนวก ง-8</u>

โครมาโตแกรมแสดงรูปแบบกรดไขมันที่พบใน**เซลล์**แบคทีเรีย *L. plantarum* NB289 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่เติมกรดไขมันไลโนเลอิกความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ที่เวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง



<u>ภาพภาคผนวก ง-9</u>

โครมาโตแกรมแสดงรูปแบบกรดไขมันที่พบใน**น้ำหมัก**ของแบคทีเรีย *L. plantarum* NB289 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่เติมกรดไขมันไลโนเลอิกความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ที่เวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง



3. ข้อมูลจากการทดลองที่ III

ตารางภาคผนวก ง-19

ข้อมูลจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB05 เพื่อผลิต CLA

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	พีเอชเริ่มต้นในการหมัก											
	พีเอช 6.7		พีเอช 5.0		พีเอช 5.5		พีเอช 6.5		พีเอช 7.0		พีเอช 7.5	
	0 ชม.	36 ชม.	0 ชม.	36 ชม.	0 ชม.	36 ชม.	0 ชม.	36 ชม.	0 ชม.	36 ชม.	0 ชม.	36 ชม.
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	0.3 ± 0.0	3.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	2.8 ± 0.1	0.4 ± 0.0	2.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1	3.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	2.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	3.0 ± 0.2
กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	5.7 ± 1.5	26.7 ± 2.6	6.8 ± 0.5	23.5 ± 0.3	6.8 ± 1.1	26.6 ± 1.1	6.9 ± 0.3	28.9 ± 1.1	7.2 ± 0.5	33.3 ± 0.4	5.9 ± 0.8	59.6 ± 3.6
ไอโซเมอร์ 9CLA-1 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	2.3 ± 0.2	13.1 ± 0.4	2.4 ± 0.1	11.0 ± 0.0	2.2 ± 0.4	9.0 ± 0.5	2.5 ± 0.1	6.5 ± 0.3	2.4 ± 0.0	15.2 ± 0.1	1.9 ± 0.4	28.4 ± 2.2
ไอโซเมอร์ 9CLA-2 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	1.8 ± 0.4	8.0 ± 0.2	1.5 ± 0.0	6.4 ± 0.3	1.6 ± 0.1	11.0 ± 0.2	1.6 ± 0.1	16.6 ± 0.8	1.6 ± 0.1	13.2 ± 0.3	1.5 ± 0.0	25.5 ± 1.2
ไอโซเมอร์ 10CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	1.6 ± 0.2	5.3 ± 2.4	2.9 ± 0.5	5.8 ± 0.1	3.0 ± 0.6	5.6 ± 0.5	2.9 ± 0.2	5.4 ± 0.3	3.3 ± 0.4	4.2 ± 0.4	2.5 ± 0.4	3.7 ± 0.5
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	21.3 ± 13.9	7.6 ± 0.9	16.3 ± 5.7	8.5 ± 0.5	17.0 ± 2.8	9.5 ± 0.7	13.8 ± 3.4	8.8 ± 0.6	14.4 ± 4.0	12.3 ± 0.6	8.4 ± 2.3	19.9 ± 2.5
ร้อยละของ CLA (% in TFA)	1.5 ± 0.4	8.8 ± 1.0	1.8 ± 0.2	7.4 ± 0.2	1.7 ± 0.3	8.1 ± 1.0	1.7 ± 0.1	8.1 ± 1.5	1.8 ± 0.1	9.9 ± 2.5	1.5 ± 0.2	17.2 ± 2.3
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	2.3 ± 0.4	32.4 ± 2.4	3.0 ± 0.2	26.9 ± 0.3	2.8 ± 0.4	41.9 ± 1.0	2.8 ± 0.1	72.6 ± 0.9	2.9 ± 0.2	43.6 ± 0.3	2.4 ± 0.3	51.6 ± 1.0

ตารางภาคผนวก ง-20

ข้อมูลจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB289 เพื่อผลิต CLA

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	พีเอชเริ่มต้นในการหมัก											
	พีเอช 6.7		พีเอช 5.0		พีเอช 5.5		พีเอช 6.5		พีเอช 7.0		พีเอช 7.5	
	0 ชม.	36 ชม.	0 ชม.	36 ชม.	0 ชม.	36 ชม.	0 ชม.	36 ชม.	0 ชม.	36 ชม.	0 ชม.	36 ชม.
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	0.3 ± 0.1	2.8 ± 0.1	0.6 ± 0.2	2.2 ± 0.2	0.5 ± 0.2	2.8 ± 0.2	0.4 ± 0.2	3.0 ± 0.1	0.5 ± 0.1	2.8 ± 0.2	0.7 ± 0.1	2.8 ± 0.2
กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	15.1 ± 0.5	69.6 ± 5.1	17.8 ± 2.0	45.7 ± 1.5	19.1 ± 0.6	60.4 ± 2.1	18.4 ± 0.7	68.6 ± 3.8	17.7 ± 0.1	94.5 ± 2.5	17.9 ± 0.7	102.6 ± 2.3
ไอโซเมอร์ 9CLA-1 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	7.3 ± 1.0	30.5 ± 3.4	8.6 ± 0.8	24.1 ± 0.9	8.7 ± 0.3	28.7 ± 1.2	8.5 ± 0.1	24.0 ± 3.2	8.2 ± 0.3	38.0 ± 1.8	8.1 ± 0.2	41.5 ± 0.4
ไอโซเมอร์ 9CLA-2 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	3.7 ± 0.3	32.3 ± 0.9	3.8 ± 0.5	15.1 ± 0.6	4.4 ± 0.4	22.4 ± 0.6	4.9 ± 0.5	36.1 ± 1.2	4.3 ± 0.4	47.9 ± 0.3	4.6 ± 0.4	51.5 ± 0.3
ไอโซเมอร์ 10CLA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	4.0 ± 0.2	5.8 ± 1.0	5.1 ± 0.4	5.5 ± 0.1	5.4 ± 0.1	6.7 ± 0.2	4.7 ± 0.2	6.0 ± 0.1	5.2 ± 0.3	4.6 ± 0.8	4.9 ± 0.3	4.5 ± 0.3
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	56.6 ± 24.0	24.9 ± 2.5	29.7 ± 13.2	20.8 ± 2.6	38.2 ± 16.5	21.6 ± 2.3	46.0 ± 24.8	22.9 ± 1.8	35.4 ± 7.6	33.8 ± 3.3	25.6 ± 4.8	36.6 ± 3.4
ร้อยละของ CLA (% in TFA)	3.3 ± 0.3	18.6 ± 2.0	3.8 ± 0.5	11.2 ± 0.9	4.0 ± 0.3	13.2 ± 0.9	3.8 ± 0.2	17.5 ± 1.8	3.8 ± 0.1	19.1 ± 2.6	3.8 ± 0.2	19.6 ± 0.6
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (%)	6.6 ± 0.3	65.7 ± 1.1	7.9 ± 0.8	40.7 ± 0.9	8.5 ± 0.4	52.5 ± 1.4	8.0 ± 0.1	71.9 ± 2.1	7.9 ± 0.2	62.0 ± 0.3	7.9 ± 0.5	63.6 ± 1.4

<u>ตารางภาคผนวกที่ ง-21</u>

สัดส่วนกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมด (%) ของ *L. plantarum* NB05

พีเอช / เวลา (ชม.)	สัดส่วนกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมด (%,w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1 Δ9	C18:0	C18:1 Δ9	C18:2 Δ9, 12	other
ไม่ปรับพีเอช (6.7)							
0	0.7 ± 0.0	2.3 ± 0.0	1.5 ± 0.0	1.0 ± 0.1	23.0 ± 0.8	60.8 ± 3.6	10.7 ± 4.4
36	0.6 ± 0.0	2.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.1	48.2 ± 1.7	25.0 ± 1.7	20.5 ± 3.3
พีเอช 5.0							
0	0.5 ± 0.0	2.4 ± 0.1	1.7 ± 0.0	0.8 ± 0.0	24.1 ± 0.2	61.5 ± 0.2	9.0 ± 0.4
36	0.7 ± 0.0	3.4 ± 0.1	1.9 ± 0.0	1.7 ± 0.0	46.9 ± 0.2	25.4 ± 0.3	19.9 ± 0.1
พีเอช 5.5							
0	0.7 ± 0.0	2.4 ± 0.2	1.6 ± 0.0	0.9 ± 0.1	24.3 ± 0.5	60.9 ± 1.3	9.2 ± 0.8
36	1.0 ± 0.0	4.2 ± 0.3	2.5 ± 0.2	1.9 ± 0.1	42.6 ± 3.0	20.3 ± 1.6	27.5 ± 5.2
พีเอช 6.5							
0	0.5 ± 0.0	2.3 ± 0.1	1.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	24.0 ± 0.4	61.1 ± 0.5	9.6 ± 0.3
36	0.8 ± 0.2	3.0 ± 0.8	1.7 ± 0.5	1.7 ± 0.4	30.4 ± 9.0	10.2 ± 3.0	52.2 ± 13.9
พีเอช 7.0							
0	0.7 ± 0.0	2.4 ± 0.1	1.6 ± 0.0	0.9 ± 0.1	23.2 ± 0.2	61.9 ± 0.1	9.3 ± 0.1
36	0.8 ± 0.0	3.5 ± 1.1	2.0 ± 0.7	1.7 ± 0.5	35.5 ± 1.9	23.1 ± 7.6	33.4 ± 2.3
พีเอช 7.5							
0	0.7 ± 0.0	2.4 ± 0.1	1.6 ± 0.0	0.9 ± 0.1	23.5 ± 0.8	62.2 ± 0.5	8.5 ± 0.5
36	1.0 ± 0.1	3.8 ± 0.2	2.3 ± 0.2	1.7 ± 0.0	27.8 ± 2.5	35.0 ± 3.1	28.6 ± 6.0

<u>ตารางภาคผนวกที่ ง-22</u>

สัดส่วนกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมด (%) ของ *L. plantarum* NB289

พีเอช / เวลา (ชม.)	สัดส่วนกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมด (%,w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1 Δ9	C18:0	C18:1 Δ9	C18:2 Δ9, 12	other
ไม่ปรับพีเอช (6.7)							
0	1.7 ± 0.2	3.0 ± 0.3	0.9 ± 0.0	1.3 ± 0.1	20.9 ± 1.7	45.9 ± 1.6	26.2 ± 3.6
36	2.9 ± 0.2	3.3 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.2	38.3 ± 3.1	25.9 ± 2.6	26.2 ± 3.9
พีเอช 5.0							
0	0	3.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	1.4 ± 0.0	23.4 ± 0.0	46.5 ± 0.6	25.0 ± 0.4
36	0.6 ± 0.0	3.6 ± 0.1	2.0 ± 0.8	1.8 ± 0.1	34.1 ± 1.5	28.2 ± 1.3	29.7 ± 4.3
พีเอช 5.5							
0	0	3.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	1.5 ± 0.0	23.2 ± 0.1	45.3 ± 0.5	26.3 ± 0.6
36	0.2 ± 0.0	4.2 ± 0.2	1.6 ± 0.8	1.8 ± 0.2	30.2 ± 0.9	26.0 ± 0.2	36.1 ± 2.0
พีเอช 6.5							
0	0.1 ± 0.0	3.3 ± 0.1	2.0 ± 0.3	1.0 ± 0.8	23.8 ± 0.3	45.9 ± 0.7	23.8 ± 2.4
36	1.9 ± 0.2	5.3 ± 0.1	2.9 ± 1.0	2.3 ± 0.1	28.6 ± 1.2	23.0 ± 0.6	36.1 ± 1.9
พีเอช 7.0							
0	0	3.4 ± 0.1	0.5 ± 0.0	1.4 ± 0.1	21.9 ± 2.8	46.7 ± 0.8	26.1 ± 2.9
36	0.5 ± 0.9	4.1 ± 0.4	2.3 ± 0.9	1.8 ± 0.2	25.2 ± 2.2	31.9 ± 2.5	34.3 ± 4.6
พีเอช 7.5							
0	0	3.5 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.6 ± 0.0	23.9 ± 0.3	46.7 ± 0.8	22.8 ± 0.8
36	6.3 ± 04	3.9 ± 0.1	0.4 ± 0.0	1.8 ± 0.0	20.7 ± 0.4	31.4 ± 0.1	35.5 ± 5.2

ตารางภาคผนวก ง-23

อิทธิพลของพีเอชเริ่มต้นต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ไอโซเมอร์ของ CLA ที่ผลิตได้ (% in total CLA) ของ *L.plantarum* NB05

พีเอชเริ่มต้นในอาหาร	ปริมาณผลิตภัณฑ์ CLA ที่ผลิตได้ (% in total CLA)				CLA ทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
	9CLA-1	9CLA-2	10CLA	CLA อื่น ๆ	
ตัวควบคุม	45.0 ± 2.6	34.7 ± 4.3	19.1 ± 6.5	1.3 ± 0.6	26.7± 2.6
พีเอช 5.0	42.6 ± 0.5	33.3 ± 1.0	23.0 ± 0.6	1.1 ± 0.2	23.5 ± 0.3
พีเอช 5.5	34.0 ± 0.7	44.0 ± 0.8	19.0 ± 0.9	3.1 ± 0.5	26.6 ± 1.1
พีเอช 6.5	20.8 ± 0.9	61.0 ± 0.6	17.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2	28.9 ± 1.1
พีเอช 7.0	46.0 ± 0.9	40.6 ± 0.4	11.7 ± 0.8	1.7 ± 0.3	33.3 ± 0.4
พีเอช 7.5	47.3 ± 1.5	44.4 ± 2.0	5.4 ± 0.3	2.9 ± 0.8	59.6 ± 3.6

ตารางภาคผนวก ง-24

อิทธิพลของพีเอชเริ่มต้นต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ไอโซเมอร์ของ CLA ที่ผลิตได้ (% in total CLA) ของ *L.plantarum* NB289

พีเอชเริ่มต้นในอาหาร	ปริมาณผลิตภัณฑ์ CLA ที่ผลิตได้ (% in total CLA)				CLA ทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
	9CLA-1	9CLA-2	10CLA	CLA อื่น ๆ	
ตัวควบคุม	39.3 ± 1.5	51.7 ± 2.1	7.9 ± 0.7	1.1 ± 0.3	69.6 ± 5.1
พีเอช 5.0	52.7 ± 0.6	33.9 ± 0.7	11.2 ± 0.3	2.3 ± 0.0	45.7 ± 1.5
พีเอช 5.5	47.6 ± 0.4	38.6 ± 0.6	10.1 ± 0.1	3.7 ± 0.1	60.4 ± 2.1
พีเอช 6.5	33.2 ± 2.1	55.7 ± 1.2	7.3 ± 0.4	3.8 ± 0.5	68.6 ± 3.8
พีเอช 7.0	38.9 ± 1.0	52.0 ± 1.8	4.9 ± 1.7	4.2 ± 0.2	94.5 ± 2.5
พีเอช 7.5	40.4 ± 0.7	51.5 ± 1.1	3.7 ± 0.3	4.4 ± 0.4	102.6 ± 2.3

ตารางภาคผนวก ง-25

อิทธิพลของพีเอชเริ่มต้นต่ออัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์แต่ละไอโซเมอร์ของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB05

พีเอชเริ่มต้น / เวลา (ชม.)	อัตราการเปลี่ยน LA เป็น CLA (%)			
	9CLA-1	9CLA-2	10CLA	Total CLA
ตัวควบคุม				
0	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.5	2.3 ± 0.4
36	19.4 ± 0.4	12.1 ± 0.2	8.7 ± 3.9	32.4 ± 2.4
พีเอชเริ่มต้น 5.0				
0	1.1 ± 0.0	0.7 ± 0.0	1.3 ± 0.2	2.0 ± 0.2
36	15.0 ± 0.2	8.5 ± 0.4	8.6 ± 0.1	26.9 ± 0.3
พีเอชเริ่มต้น 5.5				
0	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.0	1.2 ± 0.2	2.8 ± 0.4
36	19.6 ± 1.1	22.6 ± 0.2	13.6 ± 1.0	41.9 ± 1.0
พีเอชเริ่มต้น 6.5				
0	1.0 ± 0.0	0.7 ± 0.0	1.2 ± 0.1	2.8 ± 0.1
36	37.8 ± 0.2	59.9 ± 1.3	33.6 ± 1.5	72.6 ± 0.9
พีเอชเริ่มต้น 7.0				
0	1.0 ± 0.0	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.2	2.9 ± 0.2
36	26.1 ± 0.5	23.3 ± 0.4	9.1 ± 0.6	43.6 ± 0.3
พีเอชเริ่มต้น 7.5				
0	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.0	1.0 ± 0.2	2.4 ± 0.3
36	33.7 ± 0.6	31.1 ± 1.4	6.5 ± 0.5	51.6 ± 1.0

ตารางภาคผนวก ง-26

อิทธิพลของพีเอชเริ่มต้นต่ออัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์แต่ละไอโซเมอร์ของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB289

พีเอชเริ่มต้น / เวลา (ชม.)	อัตราการเปลี่ยน LA เป็น CLA (%)			
	9CLA-1	9CLA-2	10CLA	Total CLA
ตัวควบคุม				
0	3.3 ± 0.5	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.1	6.6 ± 0.3
36	46.5 ± 1.7	46.5 ± 2.0	13.9 ± 1.8	65.9 ± 1.1
พีเอชเริ่มต้น 5.0				
0	4.0 ± 0.4	1.8 ± 0.2	2.4 ± 0.2	7.9 ± 0.8
36	26.6 ± 0.7	18.3 ± 0.8	7.8 ± 0.1	40.7 ± 0.9
พีเอชเริ่มต้น 5.5				
0	4.1 ± 0.1	2.1 ± 0.2	2.6 ± 0.1	8.5 ± 0.4
36	34.5 ± 1.3	28.9 ± 1.2	11.3 ± 0.4	52.5 ± 1.4
พีเอชเริ่มต้น 6.5				
0	3.8 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	8.0 ± 0.1
36	47.5 ± 4.7	57.0 ± 1.8	18.1 ± 0.4	71.9 ± 2.1
พีเอชเริ่มต้น 7.0				
0	3.8 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.4 ± 0.1	7.9 ± 0.2
36	39.8 ± 0.6	45.1 ± 1.0	7.3 ± 0.5	62.0 ± 0.3
พีเอชเริ่มต้น 7.5				
0	3.7 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.3 ± 0.2	7.9 ± 0.5
36	41.4 ± 1.1	46.7 ± 1.9	7.4 ± 0.7	63.6 ± 1.4

5. ข้อมูลจากการทดลองที่ V

ตารางภาคผนวก ง-27

การติดตามการเจริญเติบโตด้วยวิธี drop plate จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. plantarum* NB05 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันและควบคุมค่าพีเอช

เวลา (ชม.)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/mL)			
	พีเอช 4.5	พีเอช 5.5	พีเอช 6.5	พีเอช 7.5
ระยะเติบโต				
0	$1.4 \pm 0.1 \times 10^{10}$	$5.7 \pm 0.5 \times 10^{9}$	$2.4 \pm 0.3 \times 10^{9}$	$2.5 \pm 0.2 \times 10^{9}$
3	$0.9 \pm 0.2 \times 10^{10}$	$2.5 \pm 0.4 \times 10^{10}$	$4.4 \pm 0.7 \times 10^{10}$	$6.3 \pm 0.7 \times 10^{9}$
6	$7.5 \pm 0.1 \times 10^{10}$	$5.9 \pm 0.2 \times 10^{11}$	$5.8 \pm 1.3 \times 10^{12}$	$1.8 \pm 0.0 \times 10^{10}$
9	$8.4 \pm 0.1 \times 10^{11}$	-	-	$0.9 \pm 0.4 \times 10^{11}$
ระยะเหนี่ยวนำการผลิต				
0	$4.1 \pm 0.1 \times 10^{11}$	$5.4 \pm 1.1 \times 10^{12}$	$1.2 \pm 0.0 \times 10^{14}$	$2.7 \pm 0.5 \times 10^{11}$
24	$1.5 \pm 0.9 \times 10^{9}$	$1.9 \pm 1.2 \times 10^{9}$	$1.2 \pm 0.2 \times 10^{12}$	$5.9 \pm 0.9 \times 10^{11}$
48	$5.2 \pm 0.1 \times 10^{7}$	$1.5 \pm 0.0 \times 10^{8}$	$1.2 \pm 0.7 \times 10^{8}$	$2.0 \pm 0.1 \times 10^{9}$

ตารางภาคผนวก ง - 28

การติดตามการเจริญเติบโตด้วยวิธี drop plate จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. plantarum* NB289 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันและควบคุมค่าพีเอช

เวลา (ชม.)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/mL)			
	พีเอช 4.5	พีเอช 5.5	พีเอช 6.5	พีเอช 7.5
ระยะเติบโต				
0	1.7 ± 0.1 x 10^{9}	1.6 ± 0.1 x 10^{9}	6.4 ± 0.2 x 10^{9}	4.2 ± 0.1 x 10^{9}
3	1.0 ± 0.2 x 10^{11}	2.0 ± 0.3 x 10^{10}	1.7 ± 0.7 x 10^{10}	1.3 ± 0.0 x 10^{10}
6	4.7 ± 0.5 x 10^{11}	1.4 ± 0.1 x 10^{11}	1.3 ± 0.1 x 10^{12}	1.2 ± 0.0 x 10^{11}
9	6.4 ± 1.3 x 10^{11}	-	-	-
ระยะเหนี่ยวนำการผลิต				
0	3.0 ± 0.2 x 10^{12}	0.5 ± 0.7 x 10^{11}	7.6 ± 0.6 x 10^{14}	6.7 ± 0.0 x 10^{12}
24	2.0 ± 0.9 x 10^{8}	8.8 ± 0.7 x 10^{8}	...	...
48	2.9 ± 0.2 x 10^{7}	6.0 ± 0.1 x 10^{8}	4.2 ± 0.4 x 10^{8}	3.2 ± 0.3 x 10^{8}

ตารางภาคผนวก ง-29

การติดตามการเจริญเติบโตด้วยวิธี drop plate จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. plantarum* NB311 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันและควบคุมค่าพีเอช

เวลา (ชม.)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/mL)			
	พีเอช 4.5	พีเอช 5.5	พีเอช 6.5	พีเอช 7.5
ระยะเติบโต				
0	2.1 ± 0.3 x 10^{9}	2.4 ± 0.3 x 10^{9}	2.5 ± 0.0 x 10^{9}	2.4 ± 0.0 x 10^{9}
3	2.1 ± 0.0 x 10^{10}	1.8 ± 0.1 x 10^{11}	1.8 ± 0.1 x 10^{10}	4.8 ± 0.3 x 10^{9}
6	2.7 ± 0.1 x 10^{11}	1.4 ± 0.1 x 10^{12}	4.0 ± 0.9 x 10^{12}	8.4 ± 0.5 x 10^{11}
9	-	-	-	-
ระยะเหนี่ยวนำการผลิต				
0	1.3 ± 0.1 x 10^{13}	2.6 ± 0.1 x 10^{12}	7.3 ± 1.3 x 10^{12}	7.0 ± 0.4 x 10^{11}
24	...	3.2 ± 0.1 x 10^{9}	2.5 ± 0.4 x 10^{9}	8.3 ± 0.0 x 10^{9}
48	2.8 ± 0.6 x 10^{7}	2.1 ± 0.1 x 10^{8}	1.0 ± 0.4 x 10^{8}	2.1 ± 0.1 x 10^{8}

<u>ตารางภาคผนวก ง-30</u>

การติดตามการเจริญเติบโตด้วยวิธี drop plate จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. plantarum* NB324 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันและควบคุมค่าพีเอช

เวลา (ชม.)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/mL)			
	พีเอช 4.5	พีเอช 5.5	พีเอช 6.5	พีเอช 7.5
ระยะเติบโต				
0	2.5 ± 0.1 x 10^{9}	3.6 ± 1.7 x 10^{10}	4.5 ± 0.0 x 10^{9}	5.3 ± 0.7 x 10^{9}
3	9.5 ± 0.5 x 10^{10}	5.1 ± 0.1 x 10^{10}	3.3 ± 0.3 x 10^{11}	4.6 ± 0.3 x 10^{10}
6	7.7 ± 0.1 x 10^{10}	2.1 ± 0.3 x 10^{12}	6.1 ± 0.1 x 10^{12}	2.5 ± 0.3 x 10^{11}
9	3.4 ± 0.4 x 10^{11}	-	-	-
ระยะเหนี่ยวนำการผลิต				
0	2.2 ± 0.3 x 10^{11}	3.0 ± 0.2 x 10^{12}	4.6 ± 0.4 x 10^{12}	2.7 ± 1.3 x 10^{11}
24	5.4 ± 0.3 x 10^{8}	1.8 ± 0.5 x 10^{9}	1.2 ± 0.1 x 10^{9}	1.1 ± 0.0 x 10^{9}
48	3.3 ± 0.1 x 10^{7}	1.5 ± 0.0 x 10^{8}	1.8 ± 0.1 x 10^{8}	1.3 ± 0.0 x 10^{8}

ตารางภาคผนวก ง-31

การติดตามการเจริญเติบโตด้วยวิธี drop plate จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. plantarum* NB289 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันและควบคุมค่าพีเอช

เวลา (ชม.)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/mL)					
	ไม่ควบคุมพีเอช 1	ไม่ควบคุมพีเอช 2	พีเอช 4.5	พีเอช 5.5	พีเอช 6.5	พีเอช 7.5
ระยะเติบโต						
0	7.8 ± 1.0 x 10^{8}	7.6 ± 0.8 x 10^{8}	1.4 ± 0.1 x 10^{8}	1.5 ± 0.1 x 10^{8}	1.6 ± 0.1 x 10^{8}	1.4 ± 0.1 x 10^{7}
3	1.9 ± 0.2 x 10^{9}	2.5 ± 0.4 x 10^{9}	1.5 ± 0.0 x 10^{9}	2.2 ± 0.1 x 10^{9}	1.1 ± 0.1 x 10^{9}	7.3 ± 1.0 x 10^{6}
6	1.4 ± 0.1 x 10^{10}	14 ± 0.1 x 10^{10}	1.0 ± 0.1 x 10^{10}	...	3.6 ± 0.1 x 10^{10}	7.0 ± 0.5 x 10^{6}
9	-	-	-	-	-	-
ระยะเหนี่ยวนำการผลิต						
0	...	2.9 ± 0.3 x 10^{10}	3.1 ± 0.1 x 10^{10}	...	...	...
24	1.7 ± 0.2 x 10^{8}	6.0 ± 0.5 x 10^{7}	5.1 ± 0.2 x 10^{6}	2.6 ± 0.4 x 10^{7}	2.7 ± 0.1 x 10^{8}	1.0 ± 0.1 x 10^{7}
48	...	1.1 ± 0.1 x 10^{5}	1.4 ± 0.0 x 10^{6}	2.8 ± 0.1 x 10^{7}	1.8 ± 0.1 x 10^{8}	2.6 ± 0.0 x 10^{8}

หมายเหตุ : Not control pH 1 (MMRS+LA) before inoculation

Not control pH 2 (MMRS)+LA beginning of stationary phase MMRS+LA

ตารางภาคผนวก ง-32

ความเข้มข้นของกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB05 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันและควบคุมค่าพีเอช

Time (h) / pH	9CLA-1 (µg/ml)				9CLA-2 (µg/ml)				10CLA (µg/ml)				Total CLA (µg/ml)				Total CLA conversion (%)			
	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5
0 h	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.8 ± 0.0	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.8 ± 0.0	2.3 ± 0.2	2.7 ± 0.1	2.4 ± 0.0	1.7 ± 0.4	0.9 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.3 ± 0.0	0.8 ± 0.2
24 h	18.9 ± 0.2	13.2 ± 0.4	0.9 ± 0.0	0.7 ± 0.1	11.0 ± 0.2	3.9 ± 0.1	1.3 ± 0.0	0.3 ± 0.4	1.3 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.8 ± 0.1	0.7 ± 0.0	31.9 ± 0.4	19.1 ± 0.2	4.0 ± 0.1	1.7 ± 0.5	19.5 ± 0.2	19.3 ± 0.4	7.3 ± 0.1	1.1 ± 0.3
48 h	18.7 ± 2.1	78.3 ± 2.8	7.1 ± 0.0	0.7 ± 0.0	12.0 ± 1.3	31.7 ± 0.7	3.1 ± 0.1	0.7 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.0	0.9 ± 0.1	32.7 ± 3.4	114.5 ± 3.5	12.2 ± 0.1	2.4 ± 0.1	20.2 ± 0.6	69.4 ± 0.1	21.1 ± 0.2	1.7 ± 0.0

ตารางภาคผนวก ง-33

ความเข้มข้นของกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB289 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันและควบคุมค่าพีเอช

Time (h) / pH	9CLA-1 (μg/ml)				9CLA-2 (μg/ml)				10CLA (μg/ml)				Total CLA (μg/ml)				Total CLA conversion (%)			
	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5
0 h	1.2 ± 0.0	1.8 ± 0.1	0.8 ± 0.0	0.9 ± 0.0	1.3 ± 0.1	0.5 ± 0.7	1.0 ± 0.0	0.2 ± 0.3	1.4 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.0 ± 0.0	0.8 ± 0.0	3.9 ± 0.1	3.6 ± 0.6	2.8 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.5 ± 0.0	1.7 ± 0.3	1.4 ± 0.0	0.8 ± 0.1
24 h	1.7 ± 0.8	12.7 ± 0.1	5.8 ± 0.3	0.8 ± 0.1	2.2 ± 0.1	4.0 ± 0.0	2.6 ± 0.1	0.4 ± 0.6	1.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.2	0.8 ± 0.1	5.4 ± 1.0	17.9 ± 0.0	10.2 ± 0.4	2.0 ± 0.8	2.4 ± 0.4	8.4 ± 0.3	8.4 ± 0.4	0.8 ± 0.3
48 h	1.1 ± 0.1	28.1 ± 0.2	35.1 ± 0.2	0.9 ± 0.1	2.5 ± 0.0	10.7 ± 0.1	7.5 ± 0.2	0.8 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.9 ± 0.2	4.9 ± 0.3	41.1 ± 0.0	44.4 ± 0.7	2.6 ± 0.2	2.2 ± 0.1	19.7 ± 0.2	30.2 ± 0.2	1.0 ± 0.1

ตารางภาคผนวก ง-34

ความเข้มข้นของกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB311 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันและควบคุมค่าพีเอช

Time (h) / pH	9CLA-1 (μg/ml)				9CLA-2 (μg/ml)				10CLA (μg/ml)				Total CLA (μg/ml)				Total CLA conversion (%)			
	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5
0 h	1.9 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.1 ± 0.3	0	1.9 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.0	1.3 ± 0.2	4.9 ± 0.04	3.9 ± 0.1	4.1 ± 0.3	2.4 ± 0.2	2.2 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.2 ± 0.2	1.2 ± 0.1
24 h	3.2 ± 0.1	7.8 ± 0.9	2.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.3	1.9 ± 0.0	0.8 ± 0.0	2.0 ± 0.0	1.2 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.2 ± 0.0	7.8 ± 0.2	11.7 ± 1.4	5.9 ± 0.0	3.2 ± 0.0	4.8 ± 0.1	6.0 ± 0.9	3.9 ± 0.0	1.5 ± 0.0
48 h	2.3 ± 0.9	16.1 ± 0.1	7.7 ± 0.2	1.7 ± 0.0	3.2 ± 0.5	5.1 ± 0.1	3.0 ± 0.4	1.5 ± 0.0	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.0	1.9 ± 0.2	1.6 ± 0.0	7.0 ± 1.8	22.6 ± 0.1	12.6 ± 0.4	8.5 ± 0.1	4.2 ± 1.1	11.5 ± 0.0	8.1 ± 0.3	2.6 ± 0.0

ตารางภาคผนวก ง-35

ความเข้มข้นของกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* NB324 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ที่แปรผันและควบคุมค่าพีเอช

Time (h) / pH	9CLA-1 (µg/ml)				9CLA-2 (µg/ml)				10CLA (µg/ml)				Total CLA (µg/ml)				Total CLA conversion (%)			
	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5
0 h	2.2 ± 0.3	1.4 ± 0.0	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.2 ± 0.1	0.7 ± 0.0	2.2 ± 0.2	1.4 ± 0.0	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1	5.6 ± 0.5	3.9 ± 0.0	4.2 ± 0.3	3.2 ± 0.1	2.6 ± 0.3	2.1 ± 0.0	2.4 ± 0.1	1.5 ± 0.0
24 h	2.4 ± 0.8	8.8 ± 0.5	4.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	3.3 ± 0.2	2.6 ± 0.0	2.8 ± 0.4	0.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.3	2.2 ± 0.4	1.2 ± 0.1	7.4 ± 1.1	13.0 ± 0.8	9.7 ± 0.9	3.3 ± 0.3	4.5 ± 0.6	7.1 ± 0.7	6.6 ± 0.5	1.5 ± 0.1
48 h	1.8 ± 0.8	21.8 ± 0.6	12.4 ± 0.2	1.4 ± 0.0	4.1 ± 0.2	4.8 ± 0.2	4.2 ± 0.3	1.1 ± 0.0	1.1 ± 0.1	1.6 ± 0.07	2.1 ± 0.0	1.3 ± 0.1	6.9 ± 0.7	28.2 ± 0.8	18.7 ± 0.5	3.7 ± 0.3	4.3 ± 0.5	15.1 ± 0.2	12.1 ± 0.3	1.7 ± 0.2

ตารางภาคผนวก ง-36

เปรียบเทียบสภาวะการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์

Strains/isolates	method	% wet weight cell (w/v)	substrate	Substrate conc. (mg/L)	CLA (mg/L)	isomers (% or mg/L)			conditions	productivity (mg/L.h)	Reference
						9CLA-1	9CLA-2	10CLA			
L. plantaum AKU1009a	resting cell	33%	LA	12% (w/v)	40,000	2%	98%	N.D	37 °C, 108 h	370.370	Kishino *et al.*, 2002
L. plantarum AKU1138	resting cell	22.5%	LA	0.4% (w/v)	450	100 mg/L	350 mg/L	N.D	37 °C, 72 h	6.250	Kishino *et al.*, 2002
L. plantarum JCM8341	resting cell	22.5%	LA	0.4% (w/v)	190	40 mg/L	150 mg/L	N.D	37 °C, 72 h	2.639	Kishino *et al.*, 2002
L. plantarum JCM1551	resting cell	22.5%	LA	0.4% (w/v)	2,020	100 mg/L	1,920 mg/L	N.D	37 °C, 72 h	28.056	Kishino *et al.*, 2002
L. plantarum JCM1551	resting cell	12%	castor oil	30,000	7,500	26%	74%	N.D	37 °C, 171 h	43.860	Ando *et al.*, 2004
L. plantarum A6-1F	resting cell	15%	LA	1,500	275.7	major	N.D	N.D	37 °C, 2 h	137.85	Zhao *et al.*, 2011
L. plantarum Ip15	active cell	-	LA	100	48.7	75%	N.D	N.D	30°C, 48 h	1.015	Liu *et al.*, 2011
L. acidophilus F0221	active cell	-	LA	500	123.9	84.21 mg/L	N.D	N.D	37°C, 40 h	3.100	Li *et al.*, 2013
L. acidophilus	active cell	-	LA	1000	106.5	-	N.D	N.D	37°C, 48 h	2.219	Lin *et al.*, 1999
L. acidophilus	active cell	-	LA	5000	93.5	-	N.D	N.D	37°C, 48 h	1.948	Lin *et al.*, 1999
B. breve KCTC3461	active cell	-	LA	1000	366	N.D	N.D	N.D	37°C, 32 h	11.438	Song *et al.*, 2005

ตารางภาคผนวก ง-37 (ต่อ)

เปรียบเทียบสภาวะการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์

Strains/isolates	method	% wet weight cell (w/v)	substrate	Substrate conc. (mg/L)	CLA (mg/L)	isomers (% or mg/L)			conditions	productivity (mg/L.h)	Reference
						9CLA-1	9CLA-2	10CLA			
P. freudenreichii ssp. *sheramnii*	active cell	-	LA	750	265	70%	N.D	N.D	20°C, 72 h	3.681	Jiang *et al.*, 1998
P. freudenreichii	active cell	-	sunflower oil	12000	78.8	N.D	N.D	N.D	30°C, 36 h	2.189	Wang *et al.*, 2007
L. plantaum NB05	active cell	-	LA (1)*	280	114.5	78.3 mg/L	31.7 mg/L	1.8 mg/L	pH 5.5, 35 °C, 56 h	2.045	-
L. plantaum NB289	active cell	-	LA (1)*	280	44.4	35.1 mg/L	7.5 mg/L	1.5 mg/L	pH 6.5, 35 °C, 56 h	0.793	-
L. plantaum NB324	active cell	-	LA (1)*	280	28.2	21.8 mg/L	4.8 mg/L	1.6 mg/L	pH 5.5, 35 °C, 55 h	0.513	-
L. plantaum NB311	active cell	-	LA (1)*	280	22.6	16.1 mg/L	5.1 mg/L	1.4 mg/L	pH 5.5, 35 °C, 55 h	0.411	-
L. plantaum NB289	active cell	-	LA (2)*	280	103.4	28.1 mg/L	69.8 mg/L	3.9 mg/L	pH 5.5, 35 °C, 55.5 h	1.880	-
L. plantaum NB289	active cell	-	LA (3)*	280	12.6	4.9 mg/L	3.8 mg/L	3.7 mg/L	35 °C, 56.2 h	0.224	-
L. plantaum NB289	active cell	-	LA (4)*	280	89.5	42.9 mg/L	37.3 mg/L	5.6 mg/L	35 °C, 56.2 h	1.593	-

*สภาวะการเพาะเลี้ยงต่างๆ ที่มีการควบคุมพีเอช,ไม่ควบคุมและการเติม LA ต่างช่วงเวลา ; (1) pH control, added LA at early stationary phase, (2) pH control, added LA at beginning of fermentation, (3) without pH control, added LA at early stationary phase, (4) without pH control, added LA at beginning of fermentation ; N.D = No Data

ตารางภาคผนวก ง-38

เปรียบเทียบสภาวะในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *L. plantarum* 289 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

Isolates	method	% wet weight cell (w/v)	substrate	Substrate conc. (mg/L)	CLA (mg/L)	isomers (mg/L)			conditions	productivity (mg/L.h)	Reference
						9CLA-1	9CLA-2	10CLA			
NB289	active cell	-	LA (1)*	280	41.1	28.1	10.7	1.2	pH 5.5, 35 °C, 55 h	0.734	-
NB289	active cell	-	LA (2)*	280	103.4	28.1	69.8	3.9	pH 5.5, 35 °C, 55.5 h	1.880	-
NB289	active cell	-	LA (3)*	280	12.6	4.9	3.8	3.7	35 °C, 56.2 h	0.224	-
NB289	active cell	-	LA (4)*	280	89.5	42.9	37.3	5.6	35 °C, 56.2 h	1.593	-

*สภาวะการเพาะเลี้ยงต่างๆ ที่มีการควบคุมพีเอช,ไม่ควบคุมและการเติม LA ต่างช่วงเวลา ; (1) pH control, added LA at early stationary phase, (2) pH control, added LA at beginning of fermentation, (3) without pH control, added LA at early stationary phase, (4) without pH control, added LA at beginning of fermentation ; N.D = No Data

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวพรกนก คีรีวัลย์
วันเดือนปีเกิด	22 เมษายน พ.ศ. 2533
ตำแหน่ง	-
ทุนการศึกษา (ถ้ามี)	-
ผลงานทางวิชาการ	พรกนก คีรีวัลย์, เทพปัญญา เจริญรัตน์, กอบกุล เหล่าเท้ง และนิติ พานิชเกษม (2559) อิทธิพลของพีเอชต่อความสามารถของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* NB324 ในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยบรูพา. ปีที่ 21 (ฉบับที่ 1) ประจำเดือน มกราคม-เมษายน พ.ศ. 2559
ประสบการณ์ทำงาน	พ.ศ. 2557 ผู้ช่วยสอนและเตรียมปฏิบัติการรายวิชา ทช. 376 จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม และ ทช.476 เทคโนโลยีการหมัก ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต พ.ศ. 2558 ลูกจ้างโครงการ (ผลักดันเอนไซม์สู่ระดับอุตสาหกรรม) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (*สวทช.*)