การพัฒนาระบบการผลิต Conjugated Linoleic Acid (CLA) ต้นแบบด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก

นางสาวอ้อยนภา แซ่ลิ้ม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2552

DEVELOPMENT OF CONJUGATED LINOLEIC ACID (CLA) PRODUCTION MODEL USING LACTIC ACID BACTERIA

Oinapha Sae-lim

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Food Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2009

การพัฒนาระบบการผลิต Conjugated Linoleic Acid (CLA) ต้นแบบ
ด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____
(ผศ. ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก)
ประธานกรรมการ

_____
(ผศ. ดร.มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

_____
(ผศ. ดร.ดวงกมล ขันธเลิศ)
กรรมการ

_____
(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปีจำนงค์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

_____
(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

อ้อยนภา แซ่ลิ้ม : การพัฒนาระบบการผลิต Conjugated Linoleic Acid (CLA) ต้นแบบด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก (DEVELOPMENT OF CONJUGATED LINOLEIC ACID (CLA) PRODUCTION MODEL USING LACTIC ACID BACTERIA) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์, 101 หน้า.

Conjugated Linoleic Acid (CLA) คือ กลุ่มของกรดไขมันที่มีลักษณะรูปร่าง และโครงสร้างเป็นไอโซเมอร์ของกรดไขมันลิโนเลอิก สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกรดแล็กติก จากการทดสอบความสามารถของ *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338, *Lactococcus lactis* TISTR1401 และแบคทีเรียกรดแล็กติกอีกจำนวน 17 ไอโซเลท ในการผลิต CLA จากน้ำมันที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกปริมาณสูง เช่น น้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลืองในอาหารเหลว MRS และ Modified MRS พบว่า แบคทีเรียที่ทดสอบทั้งหมดสามารถสร้าง CLA ได้สูงเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว Modified MRS ซึ่งแบคทีเรีย N25-7, N25-19 และ TISTR1401 สามารถสร้าง CLA ทั้งหมด และไอโซเมอร์เฉพาะได้สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-10, *cis*-12-18:2 ดังนั้นจึงเลือกมาตรวจสอบปัจจัยการผลิต CLA ที่เหมาะสม โดยทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Modified MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการตรวจสอบผลของขนาดหยดน้ำมัน พบว่าไม่มีผลต่อปริมาณการสร้าง CLA ทางสถิติ ส่วนความเข้มข้นของน้ำมันที่เหมาะสมในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียที่ทดสอบคือ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับความความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น, อุณหภูมิบ่ม และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ทดสอบ เมื่อทดสอบผลของการใช้กล้าเชื้อผสมต่อปริมาณการสร้าง CLA จากน้ำมันดอกทานตะวัน พบว่า การผสมแบคทีเรีย N25-19 และ TISTR1401 จะทำให้เกิดการสร้าง CLA สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉลี่ย 64.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน โดยมี CLA1 และ CLA2 ปริมาณ 26.66 และ 37.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน ตามลำดับ ส่วนการใช้กล้าเชื้อเดี่ยว พบว่า TISTR1401 มีการสร้าง CLA สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 57.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน โดยมี CLA1 และ CLA2 ปริมาณ 23.98 และ 33.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน ตามลำดับ นำแบคทีเรีย TISTR1401 มาศึกษาการผลิต CLA ในแต่ละช่วงเวลาในถังหมักปริมาตร 5 ลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้อาหารเหลว Modified MRS ที่มีน้ำมันดอกทานตะวันหรือน้ำมันถั่วเหลืองเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบการผลิต CLA จากน้ำมันดอกทานตะวันสูงที่สุดที่ระยะเวลาบ่ม 24 ชั่วโมง ปริมาณ 69.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน ประกอบด้วย CLA1 และ CLA2 ปริมาณ 33.51 และ 36.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน ตามลำดับ ส่วนการผลิต CLA จากน้ำมันถั่วเหลือง พบปริมาณการผลิตสูงที่สุดที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชั่วโมง

ปริมาณ 61.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน โดยจะมีการผลิต CLA1 และ CLA2 ปริมาณ 34.51 และ 26.77 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน ตามลำดับ

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

OINAPHA SAE-LIM : DEVELOPMENT OF CONJUGATED LINOLEIC ACID (CLA) PRODUCTION MODEL USING LACTIC ACID BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. MANOTE SUTHEERAWATTANANONDA, Ph.D., 101 PP.

CONJUGATED LINOLEIC ACID/LACTIC ACID BACTERIA/PRODUCTION/ SUNFLOWER OIL/SOYBEAN OIL

Conjugated linoleic acid (CLA), a group of positional and geometric isomers of linoleic acid with conjugated double bonds, is produced from free linoleic acid by various microorganisms, especially lactic acid bacteria. *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338, *Lactococcus lactis* TISTR1401 and seventeen lactic acid bacterial isolates were tested for their ability to produce CLA from high content linoleic acid oils such as sunflower and soybean oils in MRS and modified MRS media. All tested bacteria were able to produce high amount of CLA when cultured in modified MRS medium. The isolates coded N25-7, N25-19 and TISTR1401 showed ability to produce high amount of total and specific isomers of CLA, especially *cis*-9, *trans*-11-18:2 and *trans*-10, *cis*-12-18:2. Therefore, these three bacterial strains were chosen for further investigation and optimization study. To determine the optimal conditions, the bacteria were anaerobically cultured in 50 ml of modified MRS medium for 48 hours. The oil droplet size did not significantly affect CLA production. The optimal concentration of sunflower and soybean oils for CLA production of tested bacteria was 0.1 mg/ml. CLA production optimized at different initial of pH medium, incubation temperature, and inoculum size varied among tested bacterial strains. CLA

production from sunflower oil using mixed starter cultures was tested. The mixture ofbacteria N25-19 and TISTR1401 was significantly found to produce the highest amount of CLA in an average of 64.48 µg/mg oil containing CLA1 and CLA2 of 26.66 and 37.82 µg/mg oil, respectively. When individual starter culture was used, TISTR1401 significantly showed the highest CLA production of 57.69 µg/mg oil containing CLA1 and CLA2 of 23.98 and 33.71 µg/mg oil, respectively. The time course for CLA production of TISTR1401 was observed in a 5-L bioreactor for 72 hours under optimal conditions. Modified MRS broth supplemented with 0.1 mg/ml of sunflower or soybean oils was used. Optimized incubation period of CLA production from sunflower oil (69.95 µg/mg oil) was 24 hours. The amounts of CLA1 and CLA2 detected during optimum incubation time were 33.51 and 36.44 µg/mg oil, respectively. CLA production from soybean oil reached a maximum at 48 hours (61.28 µg/mg oil) producing CLA1 and CLA2 at 34.51 and 26.77 µg/mg oil, respectively.

School of Food Technology Student's Signature_____

Academic Year 2009 Advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ประสิทธิ์ประสาทความรู้ ให้คำแนะนำ ปรึกษา ช่วยแก้ปัญหา และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง อาจารย์ประจำสาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ ที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ ให้คำแนะนำ ปรึกษา ช่วยแก้ปัญหา อำนวยความสะดวกทั้งสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการปฏิบัติงานด้านจุลชีววิทยา และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด

กราบขอบพระคุณคณาจารย์สาขาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร ที่ให้ความรู้ในด้านวิชาการตั้งแต่การศึกษาในระดับปริญญาตรีจนถึงระดับปริญญาโท

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อำนวยความสะดวกทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ด้วยดีตลอดการดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้โอกาสทางการศึกษา และสนับสนุนทุนการศึกษา ซึ่งทำให้ผู้วิจัยได้มีโอกาสศึกษาต่อในระดับปริญญาโท

ขอบคุณพี่ เพื่อน และน้องบัณฑิตศึกษาสาขาเทคโนโลยีอาหาร และผู้ช่วยนักวิจัยประจำหน่วยวิจัยเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์และการใช้ประโยชน์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทุกท่านที่ให้คำปรึกษาด้านวิชาการ ประสบการณ์ และให้กำลังใจมาโดยตลอด

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ มารดา บิดา พี่สาว และพี่ชายที่ให้ความรัก การดูแลเอาใจใส่ การสนับสนุนการศึกษา และให้กำลังใจมาโดยตลอด และขอขอบพระคุณครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ให้ความรู้ตั้งแต่ระดับประถมศึกษาจนถึงระดับมัธยมศึกษา จนทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในด้านการศึกษา

อ้อยนภา แซ่ลิ้ม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....ก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....ค

กิตติกรรมประกาศ.....จ

สารบัญ.....ฉ

สารบัญตาราง.....ญ

สารบัญรูป.....ฏ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....ณ

บทที่

1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2

1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....3

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น.....3

1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....3

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5

2.1 คอนจูเกตลิโนเลอิกแอซิด (Conjugated Linoleic Acid, CLA).....5

2.1.1 โครงสร้างทางเคมี และการค้นพบ.....5

2.1.2 แหล่งที่พบ และปริมาณ CLA.....5

2.1.3 ความสำคัญของ CLA.....8

2.2 การสังเคราะห์ CLA (CLA synthesis).....11

2.2.1 การสังเคราะห์ CLA ทางเคมี.....11

2.2.2 การสังเคราะห์ CLA ทางชีวภาพ.....13

2.3 วิธีการตรวจวิเคราะห์ CLA….....14

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.1 วิธี Gas chromatography (GC).....16

2.3.2 วิธี Silver ion หรือ Argentation high performance liquid chromatography (Ag^{+}-HPLC).....19

2.3.3 วิธี Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS).....19

2.4 แบคทีเรียกรดแล็กติก.....22

2.4.1 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแล็กติก.....22

2.4.2 บทบาทของแบคทีเรียกรดแล็กติกต่อการผลิต CLA….....24

3 วัสดุและวิธีการ.....33

3.1 แบคทีเรีย.....33

3.2 อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย.....33

3.3 วัตถุดิบที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต CLA.....33

3.4 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้าง CLA จากน้ำมันดอกทานตะวัน และ/หรือน้ำมันถั่วเหลือง.....34

3.4.1 การเตรียมแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA.....34

3.4.2 การทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติก.....34

3.4.3 การตรวจสอบปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตด้วยวิธี Standard plate count.....35

3.4.4 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง.....35

3.4.5 การตรวจวิเคราะห์ CLA เชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ.....35

3.5 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียกรดแล็กติก.....39

3.6 การตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือก.....39

3.6.1 การศึกษาขนาดหยดน้ำมันในระบบอิมัลชันที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA.....39

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.6.2 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันดอกทานตะวันและน้ำมันถั่วเหลือง ที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA 41
3.6.3 การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม ต่อการสร้าง CLA.....41
3.6.4 การศึกษาอุณหภูมิบ่มที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA.....41
3.6.5 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA.....42
3.7 การทดสอบการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกแบบกล้าเชื้อผสม.....42
3.8 ศึกษาการผลิต CLA ในระบบถังหมักแบบเป็นชุด (Batch fermentation) ในระดับห้องปฏิบัติการ.....42
3.8.1 การเตรียมกล้าเชื้อ.....43
3.8.2 การเลี้ยงเชื้อในระบบถังหมัก.....43
3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....43
3.10 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล.....43
4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....44
4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้าง CLA จากน้ำมัน ดอกทานตะวัน และ/หรือน้ำมันถั่วเหลือง.....44
4.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย กรดแล็กติก.....54
4.3 การตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง CLA ของแบคทีเรีย กรดแล็กติกที่คัดเลือก.....57
4.3.1 การศึกษาขนาดหยดน้ำมันในระบบอิมัลชันที่เหมาะสม ต่อการสร้าง CLA.....57
4.3.2 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA.....62
4.3.3 การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม ต่อการสร้าง CLA….....66
4.3.4 การศึกษาอุณหภูมิบ่มที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA.....70

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.5 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA.....72
4.4 การทดสอบการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกแบบกล้าเชื้อผสม.....75
4.5 ศึกษาการผลิต CLA ในระบบถังหมักแบบเป็นชุด (Batch fermentation) ในระดับห้องปฏิบัติการ.....76
5 บทสรุป.....83
รายการอ้างอิง.....84
ภาคผนวก.....92
ประวัติผู้เขียน.....101

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ปริมาณ CLA ในอาหารชนิดต่าง ๆ 7
2.2 ผลของ CLA ต่อองค์ประกอบในร่างกายของหนูทดลอง.....10
2.3 ปริมาณ CLA ทางการค้าแต่ละไอโซเมอร์ที่ตรวจพบ.....12
2.4 ปริมาณการผลิต CLA โดยแบคทีเรียแต่ละชนิด.....15
2.5 สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีศักยภาพในการผลิต CLA จากกรดไขมันลิโนเลอิก ในรูปอิสระ.....26
4.1 สัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบการสร้าง CLA เจริญบน อาหารแข็ง MRS อายุ 24 ชั่วโมง.....49
4.2 ปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....50
4.3 ปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....51
4.4 ปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบในอาหารเหลว Modified MRS ที่มีน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....52
4.5 ปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบในอาหารเหลว Modified MRS ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....53
4.6 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบ บนอาหารสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปส และอาหารสูตรดัดแปลง.....56
4.7 ขนาดหยดน้ำมันในระบบอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำที่เตรียมได้.....59
4.8 ผลของขนาดหยดน้ำมันดอกทานตะวันต่อปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติก.....60
4.9 ผลของขนาดหยดน้ำมันถั่วเหลืองต่อปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติก.....61
4.10 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญ และปริมาณ การสร้าง CLA ทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7.....67

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.11 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-19.....68
4.12 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401.....69
4.13 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7.....72
4.14 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-19.....73
4.15 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401.....74
4.16 ปริมาณการสร้าง CLA จากการใช้กล้าเชื้อผสมเปรียบเทียบกับการใช้กล้าเชื้อเดี่ยว.....77
4.17 เปรียบเทียบปริมาณการสร้าง CLA จากน้ำมันที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกสูงของแบคทีเรียแต่ละชนิด.....81

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันลิโนเลอิก และ CLA บางไอโซเมอร์.....6

2.2 การสังเคราะห์ CLA ด้วยกระบวนการ Biohydrogenation ในกระเพาะหมัก และภายในเนื้อเยื่อ และต่อมสร้างน้ำนมด้วยเอนไซม์ Δ^9-Desaturase ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง.....16

2.3 โครมาโทแกรมบางส่วนของ CLA ทางการค้าที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas chromatography โดยใช้คอลัมน์แคปปิลารีชนิด CP-Sil 88 ยาว 100 เมตร ในการตรวจวิเคราะห์.....18

2.4 โครมาโทแกรมลำดับการแยกไอโซเมอร์ CLA ที่ตำแหน่ง 6, 8-13, 15 เมื่อมีโครงแบบที่แตกต่างกัน ตรวจแยกด้วยเทคนิค Gas chromatography.....18

2.5 โครมาโทแกรมการแยก CLA ทางการค้าที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Ag^+-HPLC และคอลัมน์ ChromSpher lipids^{TM} 2 คอลัมน์ต่อกัน โดยใช้อะซีโทไนไทรล์เข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตรในเฮกเซนเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัด CLA ที่ 234 นาโนเมตร.....20

2.6 โครมาโทแกรมลำดับการแยกไอโซเมอร์ CLA ที่ตำแหน่ง 6, 8-13, 15 เมื่อมีโครงแบบที่แตกต่างกันเมื่อตรวจแยกด้วยเทคนิค Ag^+-HPLC.....21

2.7 ลักษณะแมสสเปกตรัม (Mass spectrum) ของอนุพันธุ์ DMOX ของ CLA ไอโซเมอร์ *trans*-10, *cis*-12-18:2.....21

2.8 วิถีการเปลี่ยนรูปร่างของกรดไขมันลิโนเลอิกไปเป็น CLA โดย *Lactobacillus acidophilus*.....25

2.9 ปริมาณการผลิต CLA ของ *Lactobacillus acidophilus* AKU 1137 จากกรดไขมันลิโนเลอิก เมื่อใช้เซลล์จากการเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่ไม่ได้เสริมและเสริมด้วยกรดไขมันลิโนเลอิกร้อยละ 0.1.....27

2.10 ปริมาณการสร้าง CLA แต่ละไอโซเมอร์ของ *Lactobacillus acidophilus* La-5 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจน ออกซิเจนเล็กน้อย และไม่มีออกซิเจน.....28

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

2.11 ปริมาณการผลิต CLA และปริมาณเซลล์ ของ *Lactobacillus acidophilus* L1 และ *Lactobacillus casei* sp. *casei* E5 ที่ทดสอบในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....28
2.12 วิถีการสร้าง CLA จากกรดไขมันไรซิโนเลอิกด้วย *Lactobacillus plantarum*.....32
3.1 โครมาโทแกรมแสดงระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสารมาตรฐาน CLA, สารมาตรฐานภายใน และ สารมาตรฐานกรดไขมันลิโนเลอิกที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ CP7420, WCOT Fused Silica, CP-Select CB for FAME.....38
4.1 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบการสร้าง CLA เจริญบนอาหารแข็ง MRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....46
4.2 ลักษณะการตกตะกอนของเกลือกรดไขมันรอบโคโลนีของแบคทีเรีย *Serratia marcescens* ที่เป็นผลบวก และแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7 ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง Lipase test, อาหารแข็ง Modified lipase test 1 และอาหารแข็ง Modified lipase test 2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 15 วัน.....55
4.3 ลักษณะอิมัลชันที่เตรียมได้.....58
4.4 ลักษณะการกระจายของขนาดหยดน้ำมันของอิมัลชันที่เตรียมได้จากน้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลือง.....59
4.5 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันดอกทานตะวันต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7.....63
4.6 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7.....63
4.7 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันดอกทานตะวันต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-19.....64
4.8 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-19.....64

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.9 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันดอกทานตะวันต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401.....65
4.10 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401.....65
4.11 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการสร้างไอโซเมอร์ CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7.....67
4.12 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการสร้างไอโซเมอร์ CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-19.....68
4.13 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการสร้างไอโซเมอร์ CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401.....69
4.14 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7.....70
4.15 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-19.....71
4.16 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401.....71
4.17 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการสร้างไอโซเมอร์ CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7.....73
4.18 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการสร้างไอโซเมอร์ CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-19.....74
4.19 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการสร้างไอโซเมอร์ CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401.....75
4.20 ปริมาณการเจริญเติบโต และการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Modified MRS ที่มีน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....78

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.21 ปริมาณการเจริญเติบโต และการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Modified MRS ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....79

ผ1 กราฟมาตรฐานของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีเซลล์รูปร่างกลม (Coccus) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 571 นาโนเมตร.....96

ผ2 โครมาโทแกรมบางส่วนของ CLA ในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ และ CLA ทางการค้า เมื่อทำปฏิกิริยา Methylation ด้วยโซเดียมเมทอกไซด์ หรือโบรอนไทรฟลูออไรด์.....99

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ANOVA	=	Analysis of variance
°C	=	Degree Celsius
CFU	=	Colony forming unit
CLA	=	Conjugated linoleic acid
CLA1	=	*cis*-9, *trans*-11-18:2 + *trans*-10, *cis*-12-18:2
CLA2	=	*trans*-9, *trans*-11-18:2
$d_{3,2}$	=	Surface-weighted mean diameter
DMRT	=	Duncan's New Multiple Range Test
et al.	=	et alia (and others)
FAMEs	=	Fatty acid methyl esters
g	=	Gram
h	=	Hour
HLB	=	Hydrophilic lipophilic balance
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
P	=	Probability
psi	=	Pound per square inch
Span 80®	=	Sorbitan monooleate
Tween 80®	=	Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate
v/v	=	Volume: volume
w/v	=	Weight: volume
×g	=	Gravitational acceleration
µg	=	Microgram
µm	=	Micrometer
%	=	Percent

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Conjugated Linoleic Acid (CLA) คือ กลุ่มของกรดไขมันที่มีลักษณะรูปร่าง และโครงสร้างเป็นไอโซเมอร์ของกรดไขมันลิโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2 n-6) แหล่งของ CLA ส่วนใหญ่พบในน้ำนม ผลิตภัณฑ์จากน้ำนม และผลิตภัณฑ์เนื้อจากสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น เนื้อโค และ เนื้อแกะ ซึ่งประมาณร้อยละ 80-90 ของ CLA ที่พบในอาหารจะอยู่ในรูป *cis*-9, *trans*-11-18:2 (Chin et al., 1992) โดยเกิดจากการสังเคราะห์ภายในเนื้อเยื่อของสัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นหลัก CLA มีความสำคัญต่อมนุษย์ในด้านการเป็นอาหารเชิงหน้าที่ (Functional food) และด้านเภสัชศาสตร์ เนื่องจากมีคุณสมบัติทางชีววิทยา (Biological properties) ที่เป็นประโยชน์หลายประการเมื่อทดสอบในสัตว์ทดลองที่เด่นชัดได้แก่ 1) การเป็นสารต้านการเกิดมะเร็ง เช่นมะเร็งผิวหนัง มะเร็งที่เต้านม และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่ง Ip et al. (1994) ได้รายงานว่าปริมาณ CLA ที่มนุษย์สุขภาพปกติโดยทั่วไปควรได้รับต่อวันประเมินจากผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง คือ 3 กรัมต่อวัน โดยจะเป็นปริมาณที่สามารถส่งผลป้องกันการเกิดโรคมะเร็งได้ 2) การลดไขมันในร่างกาย โดยไอโซเมอร์หลักที่มีบทบาทคือ *trans*-10, *cis*-12-18:2 และ 3) การป้องกันภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerosis) นอกจากนั้นยังแสดงคุณสมบัติเป็นสารต้านการเกิดอนุมูลอิสระ ส่งเสริมการสร้างกระดูก มีส่วนช่วยในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และรักษาระดับน้ำตาลในเลือดและอินซูลินให้ปกติ (Belury, 2002a)

ในปัจจุบันการสังเคราะห์ CLA สามารถทำได้ 2 วิธีหลัก คือ การสังเคราะห์ทางเคมี และการสังเคราะห์โดยอาศัยกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งการสังเคราะห์ทางเคมีที่ใช้ในการผลิต CLA ทางการค้าคือ การไอโซเมอร์ไรเซชันของกรดไขมันลิโนเลอิกในสภาวะด่าง (Alkali isomerization) ที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 180 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการที่ให้ผลผลิตสูงประมาณร้อยละ 95 สามารถผลิตได้ในเชิงเศรษฐกิจ (Economically viable) โดย CLA ที่ได้จะมีไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-10, *cis*-12-18:2 ในปริมาณที่เท่ากัน ส่วนการสังเคราะห์โดยอาศัยกระบวนการทางชีวภาพเกิดขึ้นจากการพบ CLA ในกระเพาะหมัก (Rumen) ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ซึ่งเกิดจากกระบวนการ Biohydrogenation ของกรดไขมันลิโนเลอิก และกรดไขมันลิโนเลนิก (Linolenic acid, C18:3) ที่ได้จากหญ้า และอาหารเลี้ยงสัตว์ของแบคทีเรียกลุ่มที่เจริญได้เฉพาะที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobic bacteria) ที่อยู่ในกระเพาะหมัก (Ruminal bacteria) เป็นสำคัญ เช่น *Butyrivibrio fibrisolvens* ซึ่งเป็นแบคทีเรีย

ชนิดหลักที่สร้าง CLA โดยการทำงานของเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรส (Linoleate isomerase) ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น (Kepler, Hirons, McNeill, and Tove, 1966, quoted in Bauman, Baumgard, Corl, and Griinari, 1999) จากการเหนี่ยวนำด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาว นอกจากแบคทีเรียในกระเพาะหมัก ยังพบว่าแบคทีเรียที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์นม เช่น *Propionibacterium freudenreichii* และแบคทีเรียในสกุล *Lcatobacillus* และ *Bifidobacterium* สามารถสร้าง CLA จากกรดไขมันลิโนเลอิกได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารเฉพาะที่เสริมด้วยกรดไขมันลิโนเลอิกอิสระ (Free linoleic acid)

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมามีงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิต CLA จากกรดไขมันลิโนเลอิกบริสุทธิ์ด้วยแบคทีเรียเผยแพร่เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria) เนื่องจากพบว่ามีศักยภาพในการสร้าง CLA และสร้างไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-10, *cis*-12-18:2 เป็นหลัก ซึ่งมีงานวิจัยรองรับแล้วว่าเป็นไอโซเมอร์ที่มีคุณสมบัติทางชีววิทยาที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ พร้อมกันนี้แบคทีเรียกรดแล็กติกยังมีคุณสมบัติที่สำคัญอย่างยิ่ง คือ เป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Generally regarded as safe, GRAS) และจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียสำหรับอาหาร (Food grade bacteria) สกุล (Genus) ที่มีการรายงานว่าสามารถผลิต CLA จากกรดไขมันลิโนเลอิกอิสระ ได้แก่สกุล *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* และ *Lactococcus* (Kishino et al., 2002; Kim and Liu, 2002) แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิต CLA จากน้ำมันที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกสูง และหาได้ง่าย เช่น น้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลืองซึ่งมีประมาณร้อยละ 68.2 และ 53.2 (Gunstone, 2002) ตามลำดับ ยังมีไม่มากนัก และมีปริมาณการผลิตได้ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับผลผลิตที่ได้จากกรดไขมันลิโนเลอิกอิสระ ดังนั้นการปรับปรุงกระบวนการผลิต CLA จากน้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลือง เริ่มตั้งแต่การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีศักยภาพในการสร้าง CLA จากน้ำมันทั้งสองชนิด และตรวจสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณการผลิต CLA จะทำให้ได้กระบวนการที่ให้ผลผลิต CLA สูงขึ้นได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติก จากน้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลือง

1.2.2 เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีศักยภาพ ในการสร้าง CLA จากน้ำมันดอกทานตะวันและน้ำมันถั่วเหลือง

1.2.3 เพื่อศึกษาชนิด และปริมาณ CLA ที่ผลิตได้ในระบบถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1.3.1 แบคทีเรียกรดแล็กติกต่างสายพันธุ์สามารถสร้าง CLA ได้แตกต่างกัน

1.3.2 แบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถสร้าง CLA จากน้ำมันที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกที่อยู่ในรูปไทร-, ได- และ/หรือโมโนกลีเซอร์ไรด์สูงได้

1.3.3 การใช้กล้าเชื้อผสมในระบบการหมักจะทำให้เกิดการส่งเสริม และ/หรือแข่งขันการสร้าง CLA ในระหว่างกระบวนการหมักได้

1.3.4 การเตรียมน้ำมันที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกสูงให้อยู่ในรูปอิมัลชันให้มีหยดน้ำมันขนาดเล็กจะส่งเสริมให้แบคทีเรียกรดแล็กติกสร้าง CLA ได้มากขึ้น

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น

1.4.1 แบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA ได้จากหน่วยวิจัยเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์และการใช้ประโยชน์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และกล้าเชื้อที่มีการทดสอบแล้วว่าสามารถสร้าง CLA ได้สูงจากกรดไขมันลิโนเลอิกบริสุทธิ์

1.4.2 น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันดอกทานตะวันที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทดสอบการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติก คือ น้ำมันทางการค้าที่ผ่านกรรมวิธีแปรรูป

1.4.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติก และการระบุสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง CLA จะพิจารณาจากปริมาณ CLA ทั้งหมด และปริมาณการสร้างไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-10, *cis*-12-18:2 ที่สูง และมีไอโซเมอร์ *trans*-9, *trans*-11-18:2 ปริมาณต่ำ

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

ทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกแต่ละสายพันธุ์โดยใช้น้ำมันดอกทานตะวันและน้ำมันถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบ คัดเลือกแบคทีเรียอย่างน้อย 3 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ/หรือ *trans*-10, *cis*-12-18:2 ได้สูงมาศึกษาสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณการสร้าง CLA ในหลอดทดลอง จากนั้นใช้สภาวะที่เหมาะสมนั้นในการ ศึกษาการผลิต CLA ในระบบถังหมักแบบเป็นชุด (Batch fermentation) ในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อประเมินความเป็นได้ในการผลิต CLA ในระดับอุตสาหกรรม

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้ระบบการผลิต CLA ต้นแบบด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก

1.6.2 ได้เชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีศักยภาพในการสร้าง CLA จากน้ำมันดอกทานตะวันและน้ำมันถั่วเหลือง

1.6.3 ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA จากน้ำมันดอกทานตะวันและน้ำมันถั่วเหลืองด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีศักยภาพในระบบถังหมัก

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คอนจูเกตลิโนเลอิกแอซิด (Conjugated Linoleic Acid, CLA)

2.1.1 โครงสร้างทางเคมี และการค้นพบ

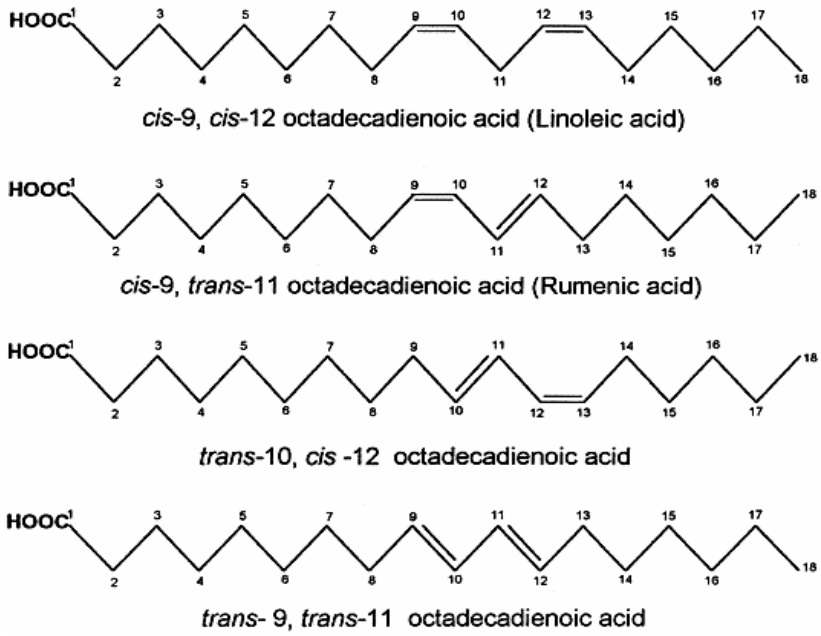
Conjugated Linoleic Acid (CLA) หรือ Conjugated octadecadienoic acid คือ กลุ่มของกรดไขมันที่มีลักษณะรูปร่าง และโครงสร้างเป็นไอโซเมอร์ของกรดไขมันลิโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2 n-6) ซึ่งจัดเป็นหนึ่งในกรดไขมันจำเป็นต่อมนุษย์ชนิดโอเมก้า 6 (Essential omega-6 fatty acid) โครงสร้างแบบคอนจูเกตนั้นจะมีพันธะคู่ 2 พันธะในโมเลกุลเรียงตัวสลับกับพันธะเดี่ยวหนึ่งพันธะ โดยไม่มีหมู่ของเมทิลีน ($-CH_2-$) คั่นกลาง ซึ่งโครงแบบ (Configuration) ของพันธะคู่ของ CLA นั้น สามารถพบได้ทั้งในรูปของ *cis* หรือ *trans* โดยตำแหน่งของพันธะคู่ 2 พันธะจะพบได้หลากหลาย คือ ที่ตำแหน่ง 6, 8; 7, 9; 8, 10; 9, 11; 10, 12; 11, 13 และ 12, 14 พร้อมทั้งมีรูปร่างที่เป็นแบบ *cis*, *cis*; *cis*, *trans; trans, cis* และ *trans*, *trans* (Mulvihill, 2001) ดังรูปที่ 2.1 โดยรวมแล้ว CLA จะมีไอโซเมอร์ทั้งหมด 28 ไอโซเมอร์ (Collomb et al., 2006) แต่ไอโซเมอร์หลักที่พบในธรรมชาติทั้งในมนุษย์และสัตว์ได้แก่ *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoic acid (Chin, Liu, Strokson, Ha, and Pariza, 1992) ซึ่งมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งคือ กรดไขมันรูมินิก (Rumenic acid) (Kramer et al., 1998) เนื่องจากเป็นไอโซเมอร์ที่เชื่อว่าถูกสังเคราะห์ขึ้นในกระเพาะหมัก (Rumen) ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

CLA ถูกค้นพบโดยบังเอิญในขณะที่ Pariza and Hargraves (1985) อ้างถึงใน Park and Pariza (2007) ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดสารก่อการกลายพันธุ์ (Mutagen) กับระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้เนื้อวัวสุก ซึ่งสารที่สกัดได้จากเนื้อวัวหลังจากทดลองนั้นมีสารประกอบที่มีคุณสมบัติต้านการเกิดการก่อกลายพันธุ์ (Anti-mutagenic activity) หลังจากการตรวจสอบชนิดของสารประกอบจึงพบว่าเป็นไอโซเมอร์ของกรดไขมันลิโนเลอิกและเรียกว่า CLA (Ha, Grimm, and Pariza, 1987, quoted in Aydin, 2005)

2.1.2 แหล่งที่พบ และปริมาณ CLA

แหล่งของ CLA ส่วนใหญ่พบในน้ำนม ผลิตภัณฑ์จากน้ำนม และผลิตภัณฑ์เนื้อจากสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น เนื้อโค และเนื้อแกะ ซึ่งประมาณร้อยละ 80-90 ของ CLA ที่พบในอาหารจะอยู่ในรูป *cis*-9, *trans*-11-18:2 (ตารางที่ 2.1) (Chin et al., 1992) ในธรรมชาติน้ำนมโคเป็นแหล่ง CLA ที่สำคัญที่สุด สามารถพบ CLA ได้ตั้งแต่ 2-37 มิลลิกรัมต่อกรัมไขมันนม ซึ่งจะขึ้นอยู่กับระยะการให้น้ำนม

อายุของสัตว์ สายพันธุ์ ฤดูกาล โภชนาการของสัตว์ และสิ่งแวดล้อมที่เลี้ยงสัตว์ โดยโภชนาการของสัตว์เป็นปัจจัยสำคัญที่สุดต่อปริมาณ CLA ในน้ำนมโค Dhiman, Arnand, Scatter, and Pariza (1999) พบว่า การให้โคกินหญ้าในทุ่งหญ้า (Pasture feeding) จะทำให้มี CLA ในน้ำนม (22.1 มิลลิกรัมต่อกรัมไขมันนม) มากกว่าการให้โคกินหญ้าผสมเมล็ดธัญพืชอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนั้นการเสริมน้ำมันจากพืชที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกสูง เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันถั่วลิสง และน้ำมันละหุ่งในอาหารให้โคทุกวันจะมีผลอย่างยิ่งต่อการเพิ่มปริมาณ CLA ในน้ำนม (Collomb et al., 2004) ซึ่งพบว่าการให้อาหารที่เสริมน้ำมันดอกทานตะวัน 53 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร นาน 2 สัปดาห์ จะทำให้น้ำนมโคมีปริมาณ CLA สูงที่สุด (24.4 มิลลิกรัมต่อกรัมไขมันนม) (Kelly et al., 1998) ในส่วนของเนื้อจากสัตว์เคี้ยวเอื้องมีปริมาณ CLA เฉลี่ย 2.7-5.6 มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน โดยจะขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ ชนิดของกล้ามเนื้อ และโภชนาการของสัตว์เป็นหลัก ในส่วนผลิตภัณฑ์จากน้ำนม และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์เคี้ยวเอื้องมีปริมาณ CLA โดยเฉลี่ย 3-7 มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน (Lin et al., 1995 and Chin et al., 1992) ปริมาณ CLA ที่พบในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ นั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณ CLA จากวัตถุดิบก่อนการแปรรูป และปริมาณไขมันของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ซึ่งกระบวนการแปรรูป และระยะเวลาในการเก็บมักไม่มีผลต่อปริมาณ CLA ในผลิตภัณฑ์ (Shantha et al. 1995 and Shantha, Crum, and Decker, 1994)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันลิโนเลอิก และ CLA บางไอโซเมอร์

ที่มา: Bessa, Santos-silva, Ribeiro, and Portugal (2000)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณ CLA ในอาหารชนิดต่าง ๆ

Food	**Total CLA (mg/g fat)**	***cis*-9, *trans*-11 isomer (%)**
Dairy products		
Homogenized milk	5.5	92
Butter	4.7	88
Sour cream	4.6	90
Plain yogurt	4.8	84
Non fat yogurt	1.7	83
Ice cream	3.6	86
Sharp cheddar cheese	3.6	93
Mozzarella cheese	4.9	95
Colby cheese	6.1	92
Cottage cheese	4.5	83
American processed cheese	5.0	93
Meat (uncooked)		
Fresh ground beef	4.3	85
Beef round	2.9	79
Veal	2.7	84
Lamb	5.6	92
Pork	0.6	82
Poultry (uncooked)		
Chicken	0.9	84
Fresh ground Turkey	2.5	76
Seafood (uncooked)		
Salmon	0.3	n.d.*
Lake trout	0.5	n.d.
Shrimp	0.6	n.d.
Vegetable oils		
Safflower	0.7	44
Sunflower	0.4	38
Canola	0.5	44
Corn	0.2	39

หมายเหตุ * n.d. หมายถึง ตรวจไม่พบ

ที่มา: Chin et al. (1992)

2.1.3 ความสำคัญของ CLA

CLA มีความสำคัญต่อมนุษย์ในด้านการเป็นอาหารเชิงหน้าที่ (Functional food) และด้านเภสัชศาสตร์ เนื่องจากมีคุณสมบัติทางชีววิทยา (Biological properties) ที่เป็นประโยชน์หลายประการเมื่อทดสอบในสัตว์ทดลอง คุณสมบัติทางชีววิทยาของ CLA ที่เด่นชัดได้แก่ การเป็นสารต้านการเกิดมะเร็ง ลดไขมันในร่างกาย และป้องกันภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerosis) นอกจากนั้นยังแสดงคุณสมบัติเป็นสารต้านการเกิดอนุมูลอิสระ ส่งเสริมการสร้างกระดูก มีส่วนในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และรักษาระดับน้ำตาลในเลือดและอินซูลินให้ปกติ (Belury, 2002a)

2.1.3.1 คุณสมบัติการเป็นสารต้านการเกิดมะเร็ง (Anticarcinogenic property)

คุณสมบัติการเป็นสารต้านการเกิดมะเร็งของ CLA ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Ha, Grimm, and Pariza (1987) อ้างถึงใน MacDonald (2000) พบว่า สารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเนื้อโคย่างซึ่งระบุได้ว่าเป็น CLA สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งผิวหนังของหนูทดลองในระยะเริ่มต้น (Initiation) เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยสารก่อมะเร็งผิวหนังชนิด 7,12-dimethybenz[a]anthracene (DMBA) CLA สามารถยับยั้งการเจริญของเนื้องอกบริเวณกระเพาะส่วนต้น (Forestomach) ของหนูเพศเมียที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเนื้องอกด้วย Benzo[a]pyrene (BP) แต่กรดไขมันลิโนเลอิก และน้ำมันมะกอกไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเนื้องอกได้ (Ha, Strokson, and Pariza, 1990, quoted in Kritchevsky, 2000) Ip et al. (1994) ศึกษาการต้านการเกิดมะเร็งเต้านม โดยให้หนูทดลองกินอาหารที่มี CLA ปริมาณร้อยละ 0.05, 0.10, 0.25 หรือ 0.5 ทุกวันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนให้สารก่อมะเร็ง DMBA พบว่า หนูที่กินอาหารที่มี CLA จะมีปริมาณเนื้องอกที่เต้านมน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการได้รับ CLA ในปริมาณมากขึ้นจะทำให้ปริมาณเนื้องอกลดลงตามลำดับ และพบว่า CLA สามารถแสดงคุณสมบัติต้านการเกิดมะเร็งได้ทั้งที่อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระ และไทรกลีเซอร์ไรด์ (Ip, Scimeca, and Thompson, 1995, quoted in Kritchevsky, 2000) โดยเชื่อว่า *cis*-9,*trans*-11-CLA เป็นไอโซเมอร์หลักที่มีคุณสมบัติ ต้านการเกิดมะเร็ง เนื่องจากไอโซเมอร์นี้สามารถรวมตัวกับฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) ที่ผนังเซลล์ ได้ซึ่งแตกต่างจากไอโซเมอร์อื่น

การศึกษาการต้านการเกิดมะเร็งของ CLA ในหลอดทดลองโดยใช้เซลล์มะเร็งของมนุษย์ โดย Shultz, Chew, Seaman, and Luedecke (1992) และ Shultz, Chew, Seaman (1992) อ้างถึงใน MacDonald (2000) นำเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมา (Melanoma) (M21-HPB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) มาเลี้ยงในอาหารเฉพาะที่เสริมด้วยกรดไขมันลิโนเลอิก หรือ CLA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (1.78-7.14 x 10^{-5} โมลาร์) เป็นเวลา 12 วัน พบว่า CLA สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ทุกความเข้มข้น และทุกระยะเวลาการทดสอบ ซึ่งแตกต่าง จากกรดไขมันลิโนเลอิกที่จะยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ที่ความเข้มข้น 3.57-7.14 x 10^{-5} โมลาร์ ที่เวลา

8-12 วัน และมีการรายงานว่า CLA ยังแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ มะเร็งได้สูงกว่าเบต้าแคโรทีน โดยเชื่อว่า CLA เป็นพิษกับเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ยับยั้งการเจริญ (Proliferation) ของเซลล์มะเร็ง Melanoma (M21-HPB) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) และเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตาย (Apoptosis)

Belury (2002b) รายงานว่า CLA สามารถแสดงคุณสมบัติต้านการเกิดมะเร็งได้ทุกระยะ ประกอบด้วยระยะเริ่มต้น (Initiation) ระยะเพิ่มจำนวน (Progression) และระยะการแพร่กระจายไปสู่บริเวณอื่น (Metastasis) โดยเชื่อว่า CLA สามารถลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ผิดปกติ ยับยั้งการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) และ DNA และทำหน้าที่เป็นสารต้านการเกิดอนุมูลอิสระช่วยลดความเป็นพิษของสารก่อมะเร็ง ซึ่ง Ip et al. (1994) ได้รายงานว่าปริมาณ CLA ที่มนุษย์สุขภาพปกติโดยทั่วไปควรได้รับต่อวัน ประเมินจากผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง คือ 3 กรัมต่อวัน โดยจะเป็นปริมาณที่สามารถส่งผลป้องกันการเกิดโรคมะเร็งได้

2.1.3.2 คุณสมบัติการลดไขมันในร่างกาย

CLA มีบทบาทสำคัญในการลดไขมันในร่างกาย และส่งเสริมการเกิดกล้ามเนื้อ ซึ่ง Park et al. (1997) อ้างถึงใน Kritcheveky (2000) ทำการศึกษาในหนูทดลองโดยให้ CLA ในปริมาณร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ประกอบด้วยไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 ร้อยละ 50 และ *trans*-10, *cis*-12-18:2 ร้อยละ 50 พบว่า ปริมาณไขมันในร่างกายของหนูทดลองลดลงคิดเป็นร้อยละ 60 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีกล้ามเนื้อเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่น้ำหนักของหนูทดลองไม่เปลี่ยนแปลง โดยที่ CLA ทั้งในรูปกรดไขมันอิสระ ไดกลีเซอร์ไรด์ และ ไทรกลีเซอร์ไรด์สามารถลดปริมาณไขมันในร่างกายของหนูทดลองได้เช่นเดียวกัน (Park and Pariza, 2007) จากการศึกษาของ Park, Strokson, Albright, Kiu, and Pariza (1999) ในหนูทดลองจึงพบว่า *trans*-10, *cis*-12-18:2 เป็นไอโซเมอร์หลักที่แสดงคุณสมบัติในการลดไขมันในร่างกาย (ตารางที่ 2.2) เช่นเดียวกับผลการศึกษาในหนูแฮมสเทอร์ที่มีภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerosis) โดยให้กินอาหารที่เสริมด้วยกรดไขมันลิโนเลอิก, CLA ไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 หรือ ไอโซเมอร์ *trans*-10, *cis*-12-18:2 ร้อยละ 0.5 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า หนูทดลองที่ได้รับอาหารเสริมด้วยไอโซเมอร์ *trans*-10, *cis*-12-18:2 เท่านั้นที่มีไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Navarro et al., 2003) ซึ่งเมื่อศึกษาบทบาทการลดไขมันในร่างกายของ CLA ในมนุษย์ โดยให้ผู้ทดสอบที่มีดัชนีมวลกาย (Body mass index) 25-35 กิโลกรัมต่อเมตร^2 ได้รับ CLA ปริมาณ 1.7, 3.4, 5.1 หรือ 6.8 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ผู้ทดสอบที่ได้รับ CLA ปริมาณมากกว่า 3.4 กรัมต่อวัน ปริมาณไขมันในร่างกายจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Blankson et al., 2000)

ตารางที่ 2.2 ผลของ CLA ต่อองค์ประกอบในร่างกายของหนูทดลอง

Group	Empty carcass weight (g)	Fat (g)	Protein (g)
Control	27.4±1.21	22.3±1.8	16.3±0.49
CLA mix	24.3±0.76	6.7±0.86	19.0±0.24
*c*9, *t*11 rich CLA	25.5±0.59	13.1±1.66	18.1±0.50
*t*10, *c*12 rich CLA	23.4±0.92	6.8±1.26	19.3±0.30

ที่มา: Park et al. (1999)

การลดไขมันในร่างกายของ CLA ประกอบด้วยกลไกหลายกลไกร่วมกัน เช่น เร่งการเผาผลาญไขมันเพื่อให้ได้พลังงาน ลดการสะสมไขมันที่เนื้อเยื่อไขมัน (Adipose tissue) โดย CLA จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Lipoprotein lipase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่นำส่งไขมันเข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อไขมัน CLA ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Stearoyl-CoA desaturase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนกรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acids) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated fatty acids) ซึ่งเป็นกรดไขมันหลักที่จะถูกนำไปสะสมที่เนื้อเยื่อไขมัน เป็นต้น

2.1.3.3 คุณสมบัติการป้องกันภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerosis)

CLA มีบทบาทในการลดปริมาณคอเลสเทอรอล (Cholesterol) ในเลือดซึ่งมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อการป้องกันภาวะ Atherosclerosis ซึ่ง Lee, Kritchevsky, and Pariza (1994) อ้างถึงใน MacDonald (2000) ทดสอบในกระต่ายที่ได้รับอาหารที่มีไขมันร้อยละ 14 และคอเลสเทอรอลร้อยละ 0.1 (Atherogenic diet) ซึ่งเสริมด้วย CLA 0.5 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นเวลา 22 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณไทรกลีเซอร์ไรด์ (Triglycerides) ไขมันที่มีความหนาแน่นต่ำ (Low density lipoprotein, LDL) และอัตราส่วนระหว่างไขมันที่มีความหนาแน่นต่ำกับไขมันที่มีความหนาแน่นสูง (High density lipoprotein) (LDL/HDL) ในเลือดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับผลการศึกษาในหนูแฮมสเทอร์ของ Nicolosi, Rogers, Kritchevsky, Scimeca, and Huth (1997) อ้างถึงใน MacDonald (2000) พบว่าหนูที่ได้รับ CLA จะมีปริมาณไทรกลีเซอร์ไรด์ และ LDL ในเลือดต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และหนูที่ได้รับกรดไขมันลิโนเลอิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ไม่มีผลต่อปริมาณ HDL นอกจากนั้น Gavino, Gavino, Lablanc, and Tuchweber (2000) ศึกษาปริมาณคอเลสเทอรอลในเลือดของหนูแฮมสเทอร์ที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงที่เสริมด้วย CLA ผสม 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 บริสุทธิ์ 2 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร และกรดไขมันลิโนเลอิก 2 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่า หนูที่ได้รับ CLA ผสมจะมีปริมาณไทรกลีเซอร์ไรด์ คอเลสเทอรอลทั้งหมด และ LDL ในเลือดต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับกรดไขมันลิโนเลอิกในระยะเวลาภายใน 2 และ 6 สัปดาห์ของการทดสอบ

แต่กลุ่มที่ได้รับไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 บริสุทธิ์จะไม่พบการลดลงของไทรกลีเซอร์ไรด์ คอเลสเทอรอลทั้งหมด และ LDL ในเลือด จึงมีความเป็นไปได้ว่าไอโซเมอร์ *trans*-10, *cis*-12-18:2 จะมีบทบาทที่สำคัญต่อการลดคอเลสเทอรอลในเลือด

2.2 การสังเคราะห์ CLA (CLA synthesis)

ในปัจจุบันการสังเคราะห์ CLA สามารถทำได้ 2 วิธีหลัก คือ การสังเคราะห์ทางเคมี และการสังเคราะห์โดยอาศัยกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.2.1 การสังเคราะห์ CLA ทางเคมี

การสังเคราะห์ CLA ทางเคมีเป็นวิธีการที่ได้ CLA ปริมาณสูง โดยมีจุดมุ่งหมายในการสังเคราะห์เพื่อให้ได้ไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-10, *cis*-12-18:2 เนื่องจากเป็นไอโซเมอร์ที่มีคุณสมบัติทางชีววิทยาที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ วิธีการสังเคราะห์ CLA มี 3 วิธีหลักได้แก่ 1) ไอโซเมอร์ไรเซชันของกรดไขมันลิโนเลอิกในสภาวะด่าง (Alkali isomerization) 2) ไอโซเมอร์ไรเซชันกรดไขมันลิโนเลอิกด้วยแสงเหนือม่วง (Ultraviolet, UV) และ 3) กระบวนการ Dehydration ของกรดไขมันไรซิโนเลอิก (Ricinoleic acid, 12-hydroxy-9-*cis*-octadecenoic acid)

2.2.1.1 ไอโซเมอร์ไรเซชันของกรดไขมันลิโนเลอิกในสภาวะด่าง

เป็นวิธีการหลักที่ใช้ในการสังเคราะห์ CLA ทางการค้าในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีการที่ให้ผลผลิตสูงประมาณร้อยละ 95 ซึ่งสามารถผลิตได้ในเชิงเศรษฐกิจ (Economically viable) CLA ที่ผลิตได้จะมีหลายไอโซเมอร์ผสมกัน โดยจะมีไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-10, *cis*-12-18:2 ในปริมาณที่เท่ากัน (ตารางที่ 2.3)

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต CLA ได้แก่ กรดไขมันลิโนเลอิกบริสุทธิ์ หรือน้ำมันจากพืชที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันลิโนเลอิกสูง เช่น น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งมีกรดไขมันลิโนเลอิกโดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 79, 68.2 และ 53.2 ตามลำดับ (Gunstone, 2002) กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันลิโนเลอิกประกอบด้วยขั้นตอนหลัก คือ การเปลี่ยนรูปร่างของกรดไขมันลิโนเลอิกไปเป็น CLA ในสภาวะด่างเข้มข้น หรือใช้ตัวเร่งโลหะ (Metal catalyst) เช่น โรเดียม นิเกิล และแพลททินัม เป็นต้น โดยจะทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 180 องศาเซลเซียส และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกกับยูเรีย

การสังเคราะห์ CLA ในสภาวะด่างเข้มข้น น้ำมันหรือกรดไขมันลิโนเลอิกบริสุทธิ์จะถูกทำให้ละลายอยู่ในโพรพิลีนไกลคอล (Propylene glycol) หรือเอทิลลีนไกลคอล (Ethylene glycol) ที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ละลายอยู่มากเกินพอ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และปรับให้เป็นกรด (2.5-3.0) ด้วยกรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) กรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟิวริก เมื่ออุณหภูมิลดลงถึง 80 องศาเซลเซียส

จากนั้นสกัด CLA ด้วยเฮกเซน และนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกกับยูเรียอิ่มตัวในเมทานอล ซึ่ง CLA ที่ได้จะอยู่ในรูปกรดไขมันอิสระ (Kim, Lee, Lee, Kim, and Lee, 2003; Yang and Liu, 2004)

ตารางที่ 2.3 ปริมาณ CLA ทางการค้าแต่ละไอโซเมอร์ที่ตรวจพบ

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, Mossoba, Kramer, Pariza, and Nelson (1999)

2.2.1.2 ไอโซเมอร์ไรซ์กรดไขมันลิโนเลอิกด้วยแสงเหนือม่วง (Photoisomerization)

แสงเหนือม่วงหรือ UV ถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์ CLA ในน้ำมันที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกสูง โดยใช้ไอโอดีนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำ ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณผลผลิต CLA ประกอบด้วยความเข้มข้นของไอโอดีน อุณหภูมิ ระยะเวลาการสัมผัสแสง UV และความหนาของชั้นน้ำมัน แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้จะได้ผลผลิต CLA ต่ำประมาณร้อยละ 16.9-20 และมีไอโซเมอร์ *trans*, *trans* สูงประมาณร้อยละ 70 (Jain, Proctor, and Lall, 2008; Gammill, Proctor, and Jain, 2010)

2.2.1.3 กระบวนการ Dehydration ของกรดไขมันไรซิโนเลอิก (Ricinoleic acid)

กรดไขมันไรซิโนเลอิกพบมากในน้ำมันเมล็ดละหุ่ง (Castor oil) สูงถึงร้อยละ 85-95 ถูกนำมาสังเคราะห์ CLA ด้วยกระบวนการ Dehydration โดยกรดไขมันไรซิโนเลอิกจะถูกทำให้อยู่ในรูป 12-Mesyloxy-octadec-9-enoate (MMOE) ด้วย Methanesulfonyl chloride และทำปฏิกิริยา Dehydration ด้วย 1,8-diazabicyclo-(5.4.0)-undec-7-ene (DBU) หรือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเอทานอล หรือ เอทิลลีนไกลคอล ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งจะมีปริมาณการเปลี่ยนรูป (Conversion) ได้ CLA ร้อยละ 77-80 ประกอบด้วยไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 ร้อยละ 72-78

และไอโซเมอร์ *cis*-9, *cis*-11-18:2 ร้อยละ 16-26 (Yang, Huang, Wang, and Chen, 2002) แต่อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์ CLA ด้วยวิธีนี้มีหลายขั้นตอนที่ยุ่งยากจึงไม่เหมาะสมกับการผลิต CLA ในเชิงการค้า

2.2.2 การสังเคราะห์ CLA ทางชีวภาพ

CLA ที่พบในน้ำนม และเนื้อจากสัตว์เคี้ยวเอื้องได้มาจาก 2 แหล่งผลิตที่สำคัญ ได้แก่ 1) เกิดจากการสังเคราะห์ CLA ในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยงเอื้อง (Rumen) และ 2) เกิดจากการสังเคราะห์ภายในเนื้อเยื่อของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

2.2.2.1 การสังเคราะห์ CLA ในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยงเอื้อง

ในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยงเอื้อง CLA เป็นสารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นระหว่างกระบวนการ (Intermediate) ของกระบวนการ Biohydrogenation ของกรดไขมันลิโนเลอิก และกรดไขมันลิโนเลนิก (Linolenic acid, C18:3) ซึ่งเป็นไขมันที่พบอยู่ในหญ้า อาจอยู่ในรูปไกลโคลิปิด (Glycolipids) และฟอสโฟลิปิด (Phospholpids) ซึ่งจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย และได้ผลผลิตเป็นกรดไขมันอิสระ (Free fatty acids) จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการ Biohydrogenation จนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดไขมันสเทียริก (Stearic acid, C18:0) การสังเคราะห์ CLA เกิดจากแบคทีเรียกลุ่มที่เจริญได้เฉพาะที่ไม่มีออกซิเจน (Anareobic bacteria) ที่อยู่ในกระเพาะหมัก (Ruminal bacteria) เป็นสำคัญ ซึ่งจากการระบุชนิดแบคทีเรียในกระเพาะหมัก พบว่า *Butyrivibrio fibrisolvens* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกชนิดหลักที่สร้าง CLA โดยการทำงานของเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรสที่แบคทีเรียผลิตขึ้น (Kepler, Hirons, McNeill, and Tove, 1966, quoted in Bauman, Baumgard, Corl, and Griinari, 1999) โดยเชื่อว่า Biohydrogenation เป็นกระบวนการลดความเป็นพิษ (Detoxification) ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาวในรูปอิสระ (Jiang, Brock, and Fonden, 1998) เนื่องจากกรดไขมันกลุ่มนี้จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในกระเพาะหมัก (Kim, Liu, Bond, and Russell, 2000) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแกรมบวก (Maczulak, Dehority, and Palmquist, 1981, quoted in Kim et al., 2000) เชื่อว่ากรดไขมันดังกล่าวจะทำหน้าที่เป็นสารต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity) ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Cytoplasmic membrane) (Boyaval, Corre, Dupuis, and Roussel, 1995, quoted in Song et al., 2005)

กระบวนการ Biohydrogenation ของกรดไขมันลิโนเลอิกจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (Kepler and Tove, 1967, quoted in Coakley et al., 2003) ดังรูปที่ 2.2 คือ 1) การเปลี่ยนรูปร่างไอโซเมอร์ (Isomerization) ของกรดไขมันลิโนเลอิกไปเป็น *cis*-9, *trans*-11-18:2 โดยเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรส (Linoleate isomerase, EC 5.2.1.5) เป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ของผนังเซลล์แบคทีเรีย (Membrane bound enzyme) (Griinari and Bauman, 1999, quoted in Khanal and Dhiman, 2004) และเฉพาะเจาะจงกับสารตั้งต้น (Substrate) ที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง

cis-9, *cis*-12 และมีหมู่คาร์บอกซิลอิสระ (Free carboxyl group) ซึ่งพบได้ในกรดไขมันลิโนเลอิก และกรดไขมันลิโนเลนิกในรูปอิสระ (Kepler, Tucker, and Tove, 1970, quoted in Khanal and Dhiman, 2004) 2) CLA จะถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูป *trans*-vaccenic acid (*trans*-11-18:1) อย่างรวดเร็วด้วยกระบวนการไฮโดรจีเนชัน (Hydrogenation) และ 3) *trans*-vaccenic acid จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันสเทียริกด้วยกระบวนการไฮโดรจีเนชัน ซึ่งขั้นตอนนี้จะเกิดด้วยอัตราที่ช้า ดังนั้นจึงมีการสะสม *trans*-vaccenic acid ในกระเพาะหมัก และถูกดูดซึมได้ (Khanal and Dhiman, 2004; Bauman et al., 1999)

นอกจากแบคทีเรียในกระเพาะหมักยังพบว่า แบคทีเรียที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์นม เช่น *Propionibacterium freudenreichii* และแบคทีเรียแกรมบวกที่อาศัยประจำอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ เช่น แบคทีเรียในสกุล *Lcatobacillus* และ *Bifidobacterium* สามารถสร้าง CLA จากกรดไขมันลิโนเลอิกได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเฉพาะที่เสริมด้วยกรดไขมันลิโนเลอิก ซึ่งมีแบคทีเรียในสกุล *Lcatobacillus* บางสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง CLA จากกรดไขมันไรซิโนเลอิก และน้ำมันละหุ่งได้ (Coakley et al., 2003; Kim, 2003; Alonso, Cuesta, and Gilliland, 2003; Lee et al., 2003; Jiang, Brock, and Fonden, 1998; Kishino, Ogawa, Omura, Matsumura, and Shimizu, 2002; Ogawa, Matsumura, Kishino, Omura, and Shimizu, 2001; Ando, Ogawa, Kishino, and Shimizu, 2003; Ando et al., 2004) ดังตารางที่ 2.4

2.2.2.2 การสังเคราะห์ CLA ภายในเนื้อเยื่อของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

CLA ที่พบในน้ำนม และเนื้อจากสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยส่วนใหญ่ (ประมาณร้อยละ 78) จะมาจากการสังเคราะห์ขึ้นภายในเนื้อเยื่อ เมื่อ *trans*-vaccenic acid ถูกดูดซึม และถูกสะสมที่ต่อมสร้างน้ำนม (Mammary gland) และเนื้อเยื่อไขมัน (Adipose tissue) จะถูกเปลี่ยนไปเป็น CLA ด้วยกระบวนการกำจัดไฮโดรเจน (Desaturation) โดยเอนไซม์ Δ^9-Desaturase ซึ่งมีกระบวนการดังรูปที่ 2.2 และ CLA จะถูกสะสมในน้ำนม และส่วนของไขมันที่แทรกอยู่ในกล้ามเนื้อของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Corl et al., 2001)

2.3 วิธีการตรวจวิเคราะห์ CLA

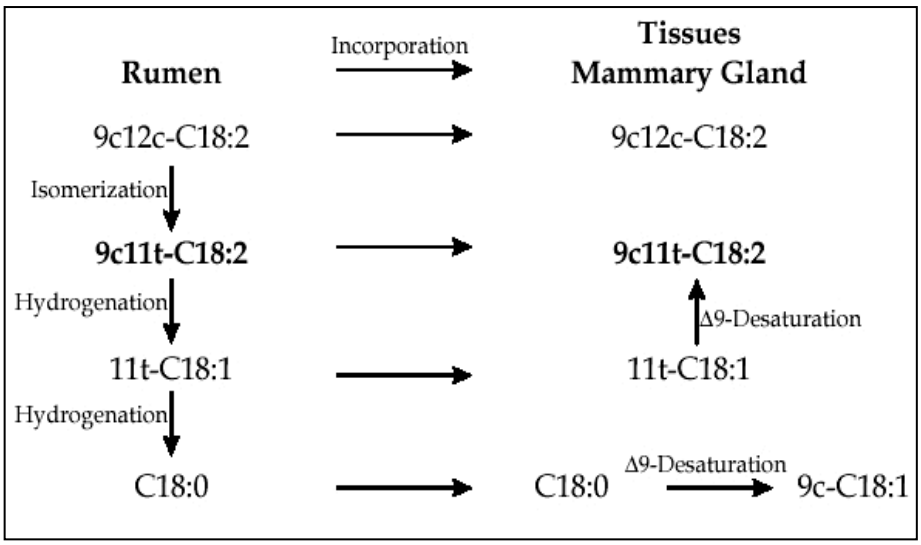
การแยก และการบ่งชี้ชนิดกรดไขมัน และ CLA โดยทั่วไปใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี (Chromatography) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจแยกวิเคราะห์ CLA ได้ทั้งคุณภาพ และปริมาณ เทคนิคโครมาโทกราฟีที่นิยมใช้ได้แก่ Gas chromatography (GC), Silver-ion (Argentation) high performance liquid chromatography (Ag^+-HPLC) และ Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)

ตารางที่ 2.4 ปริมาณการผลิต CLA โดยแบคทีเรียแต่ละชนิด

Species	Reaction method[a]/ Substrate[b]	CLA isomers	Productivity (mg/L)
Bifidobacterium breve	c/LA	*cis*-9, *trans*-11 (91%), *trans*-9, *trans*-11 (9%)	398
Bifidobacterium angulatum	c/LA	*cis*-9, *trans*-11 (50%), *trans*-10, *cis*-12 (50%)	1.2
Bifidobacterium bifidum	c/LA	*cis*-9, *trans*-11 (100%)	1.0
Bifidobacterium aldolescentis	c/LA	*cis*-9, *trans*-11 (46%), *trans*-9, *trans*-11 (20%), *trans*-10, *cis*-12 (34%)	3.5
Bifidobacterium dentium	c/LA	*cis*-9, *trans*-11 (78%), *trans*-9, *trans*-11 (21%), *trans*-10, *cis*-12 (1%)	160
Bifidobacterium infantis	c/LA	*cis*-9, *trans*-11 (74%), *trans*-9, *trans*-11 (19%), *trans*-10, *cis*-12 (7%)	24.6
Bifidobacterium lactis	c/LA	*cis*-9, *trans*-11 (90%), *trans*-9, *trans*-11 (8%), *trans*-10, *cis*-12 (2%)	170
Bifidobacterium pseudocatenulatum	c/LA	*cis*-9, *trans*-11 (72%), *trans*-9, *trans*-11 (19%), *trans*-10, *cis*-12 (9%)	23.3
Butyrivibrio fibrisolvens	r/LA	*cis*-9, *trans*-11 (95%)	220
Lactobacillus acidophilus	c/LA	*cis*-9, *trans*-11 (85%), *trans*-9, *trans*-11 (5%), *trans*-10, *cis*-12 (10%)	131
Lactobacillus casei	c/LA	*cis*-9, *trans*-11 (85%), *trans*-9, *trans*-11 (3%), *trans*-10, *cis*-12 (12%)	111
Lactobacillus acidiphilus	r/LA	*cis*-9, *trans*-11 (67%), *trans*-9, *trans*-11 (33%)	4,900
Lactobacillus plantarum	r/LA	*cis*-9, *trans*-11 (38%), *trans*-9, *trans*-11 (62%)	40,000
Lactobacillus plantarum	r/RA	*cis*-9, *trans*-11 (21%), *trans*-9, *trans*-11 (79%)	2,400
Lactobacillus plantarum	r/CO	*cis*-9, *trans*-11 (26%), *trans*-9, *trans*-11 (74%)	2,700
Lactobacillus reuteri	r/LA	*cis*-9, *trans*-11 (59%), *trans*-10, *cis*-12 (41%)	300
Propionibacterium freudenreichii	c/LA	*cis*-9, *trans*-11 (93%)	265

หมายเหตุ [a]c, cultivation; r, resting cell reaction, [b]LA, linoleic acid; RA, ricinoleic acid; CO, castor oil

ที่มา: Ogawa et al. (2005)



รูปที่ 2.2 การสังเคราะห์ CLA ด้วยกระบวนการ Biohydrogenation ในกระเพาะหมัก และภายในเนื้อเยื่อและต่อมสร้างน้ำนมด้วยเอนไซม์ Δ^9-Desaturase ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

ที่มา: Bauman et al. (1999)

2.3.1 วิธี Gas chromatography (GC)

เทคนิค GC สามารถตรวจวิเคราะห์ CLA ได้ทั้งคุณภาพ และปริมาณ โดยจะตรวจวิเคราะห์ CLA ที่อยู่ในรูปเมทิลหรือเอทิลเอสเทอร์ (Methyl or Ethyl ester) ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ การสกัดไขมัน การเตรียมกรดไขมันอิสระให้อยู่ในรูปเอสเทอร์โดยเติมหมู่เมทิล (Methylation) และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี

การสกัดไขมันออกจากตัวอย่างจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) ในการสกัด โดยทั่วไปใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ผสมเพื่อให้เกิดการละลายของไขมันที่ไม่มีขั้ว (Non polar) ครอบคลุมถึงไขมันที่มีขั้วเล็กน้อย ซึ่งจะสามารถสกัดไขมันได้ตั้งแต่กรดไขมันสายโซ่สั้น (Short chain fatty acids) จนถึงสายโซ่ยาว (Long chain fatty acids) ตัวทำละลายอินทรีย์ผสมที่นิยมใช้ได้แก่ คลอโรฟอร์มกับเมทานอล เฮกเซนกับไอโซโพรพานอล และอาจใช้เฮกเซนเพียงอย่างเดียว

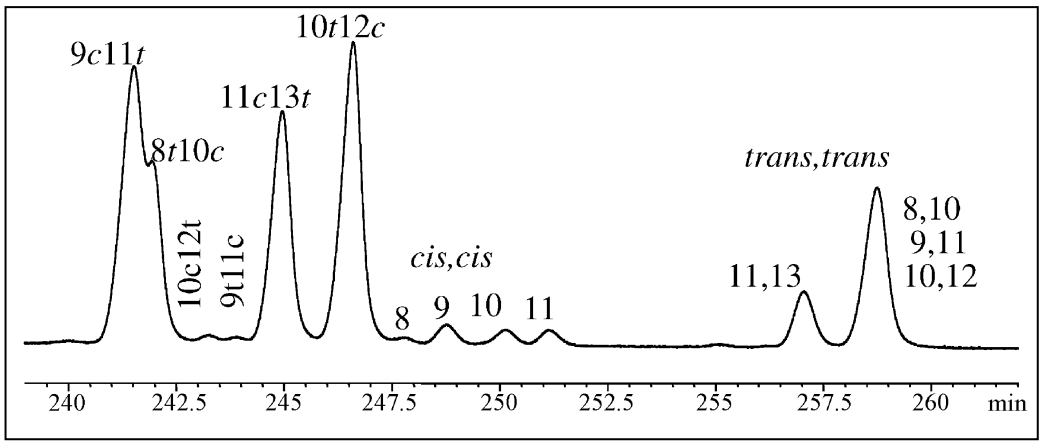
การเตรียมกรดไขมันให้อยู่ในรูปเอสเทอร์โดยเติมหมู่เมทิล ($-CH_2-$) หรือเอทิล ($-CH_2- CH_2-$) เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนกรดไขมันให้อยู่ในรูปที่มีขั้วน้อยลง และมีจุดเดือดต่ำลง โดยพื้นฐานการเตรียมกรดไขมันมี 2 วิธีหลัก คือ 1) การย่อยไขมัน (Lipid hydrolysis) ด้วยด่าง หรือปฏิกิริยาสปอนนิฟิเคชัน (Saponification) ซึ่งจะทำให้กรดไขมันที่อยู่ในรูป ไทร-, ได- หรือ โมโน- กลีเซอร์ไรด์ให้อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระ จากนั้นจึงทำปฏิกิริยา Methylation กรดไขมันอิสระด้วยตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) ที่เป็นกรดในเมทานอล 2) ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยตรง (Direct transesterification) ด้วย

ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดหรือด่างในสภาวะที่ไม่มีน้ำ (Aldai, Murray, Nájera, Troy, and Osoro, 2005) ประกอบด้วย 2 ปฏิกิริยาหลัก ได้แก่ Acid-catalyzed transesterification และ Base-catalyzed transesterification

ปฏิกิริยาAcid-catalyzed transesterification สารประกอบที่นิยมใช้ในการทำปฏิกิริยาได้แก่ โบรอนไทรฟลูออร์ไรด์ในเมทานอล (BF_3-methanol) ซัลฟิวริกในเมทานอล (H_2SO_4-methanol) และไฮโดรเจนคลอไรด์ในเมทานอล (HCl-methanol) โดยสามารถเติมหมู่เมทิลกับไขมันที่อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระ ฟอสโฟลิปิด และ ไทรกลีเซอร์ไรด์ แต่อย่างไรก็ตามปฏิกิริยานี้มีข้อเสียคือจะทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปร่างของ CLA (Isomerization) จาก *cis*, *trans* เป็น *trans*, *trans* และเกิดสารเมทอกซีและ ไฮดรอกซี (Methoxy and hydroxy artifacts) (Kramer et al., 1997) นอกจากนั้นการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง (80-100 องศาเซลเซียส) ระยะเวลามากกว่า 30 นาที มีผลให้ปริมาณ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-10, *cis*-12-18:2 ลดลง และเพิ่มปริมาณ *trans*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-10, *trans*-12-18:2 แต่การใช้อุณหภูมิต่ำ และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาสั้นลง เช่น โบรอนไทรฟลูออร์ไรด์เข้มข้นร้อยละ 12 ในเมทานอล หรือไฮโดรเจนคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 4 ในเมทานอล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จะเกิดปฏิกิริยา Methylation ของ CLA ทางการค้าทั้งในรูปไทรกลีเซอไรด์และกรดไขมันอิสระอย่างสมบูรณ์ และไม่เกิดการเปลี่ยนรูปร่างของ CLA (Park, Albright, Cai, and Pariza, 2001)

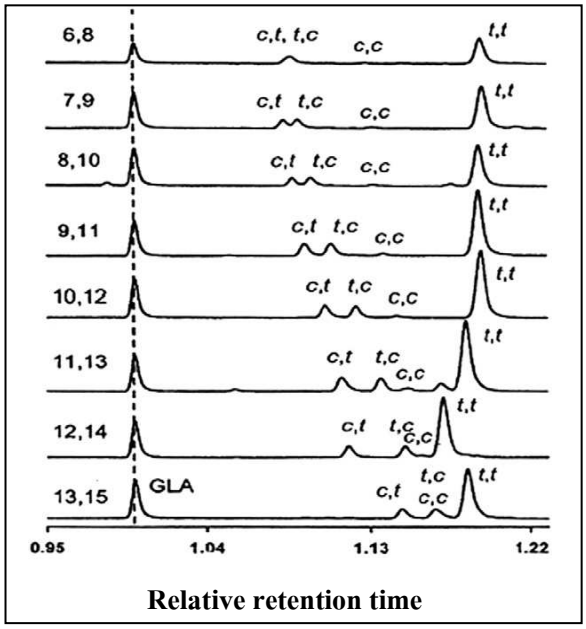
ปฏิกิริยา Base-catalyzed transesterification เป็นปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง (Mild conditions) และนิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากเป็นปฏิกิริยาที่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปร่างของ CLA จาก *cis*, *trans* เป็น *trans*, *trans* และไม่เกิดสารเมทอกซี (Methoxy artifacts) แม้จะทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส สามารถเติมหมู่เมทิลกับไขมันที่อยู่ในรูปไทรกลีเซอร์ไรด์ แต่ไม่สามารถเติมหมู่เมทิลกับกรดไขมันอิสระ และสฟิงโกลิปิด (Sphingolipids) สารประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาได้แก่ โซเดียมเมทอกไซด์ในเมทานอล (Sodium methoxide-methanol) และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล (KOH-methanol) (Kramer et al., 1997) ซึ่งการใช้โซเดียมเมทอกไซด์ในเมทานอลจะทำให้เกิดปฏิกิริยา Methylation ของ CLA ทางการค้าที่อยู่ในรูปไทรกลีเซอร์ไรด์อย่างสมบูรณ์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที และไม่เกิดไอโซเมอร์ไรเซชันของ CLA และสารประกอบใหม่ (Park et al., 2001)

นอกจากนั้นมีการใช้สารประกอบ Diazomethane หรือ Trimethylsilyldiazomethane (Park et al., 2001; Sehat et al., 1998) ในการทำปฏิกิริยา Methylation กรดไขมันอิสระ และไขมันประเภทกลีเซอร์โรลิปิด (Glycerolipids) ได้ แต่ไม่สามารถทำปฏิกิริยา Methylation กับกรดไขมันที่อยู่ในรูปกลีเซอร์ไรด์ได้ แต่อย่างไรก็ตาม Diazomethane เป็นสารที่มีพิษสูง ถัดกร่อน และเป็นสารก่อมะเร็ง จึงนิยมใช้ Trimethylsilyldiazomethane ซึ่งไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนไอโซเมอร์ของ CLA แต่จะเกิดสารประกอบใหม่ (Artifacts) เล็กน้อย



รูปที่ 2.3 โครมาโทแกรมบางส่วนของ CLA ทางการค้าที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas chromatography โดยใช้คอลัมน์แคปปิลารีชนิด CP-Sil 88 ยาว 100 เมตร ในการตรวจวิเคราะห์

ที่มา: Roach, Mossoba, Yurawecz, and Kramer (2002)



รูปที่ 2.4 โครมาโทแกรมลำดับการแยกไอโซเมอร์ CLA ที่ตำแหน่ง 6, 8-13, 15 เมื่อมีโครงแบบที่แตกต่างกัน ตรวจแยกด้วยเทคนิค Gas chromatography

ที่มา: Delmonte, Roach, Mossoba, Losi, and Yurawecz (2004)

การวิเคราะห์ CLA ด้วยเทคนิค Gas chromatography-Frame ionization detector (GC-FID) และใช้คอลัมน์แบบแคปปิลารีที่มีเฟสคงที่ (Stationary phase) ที่มีขั้วสูง เช่น Cyanopropyl polysilicoxane สามารถแยก CLA ที่มีตำแหน่งพันธะคู่ และรูปร่างที่แตกต่างกันได้ คอลัมน์ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ CLA ได้แก่ CP sill 88™, SP-2560™ และ BPX-70™ (Christe, Dobson, and Adlof, 2007; Roach et al., 2002; de la Fuente, Luna, and Juárez, 2006) รูปที่ 2.3 แสดงโครมาโทรแกรมการแยก CLA ทางการค้าที่อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ด้วย GC-FID และคอลัมน์ CP Sil 88 ยาว 100 เมตร CLA ที่มีรูปร่างแบบ *cis*, *trans* หรือ *trans*, *cis* จะถูกแยกออกมาเป็นลำดับแรก และตามด้วย CLA ที่มีรูปร่าง *cis*, *cis* และ *trans*, *trans* ตามลำดับ (รูปที่ 2.4)

2.3.2 วิธี Silver ion หรือ Argentation high performance liquid chromatography (Ag^+-HPLC)

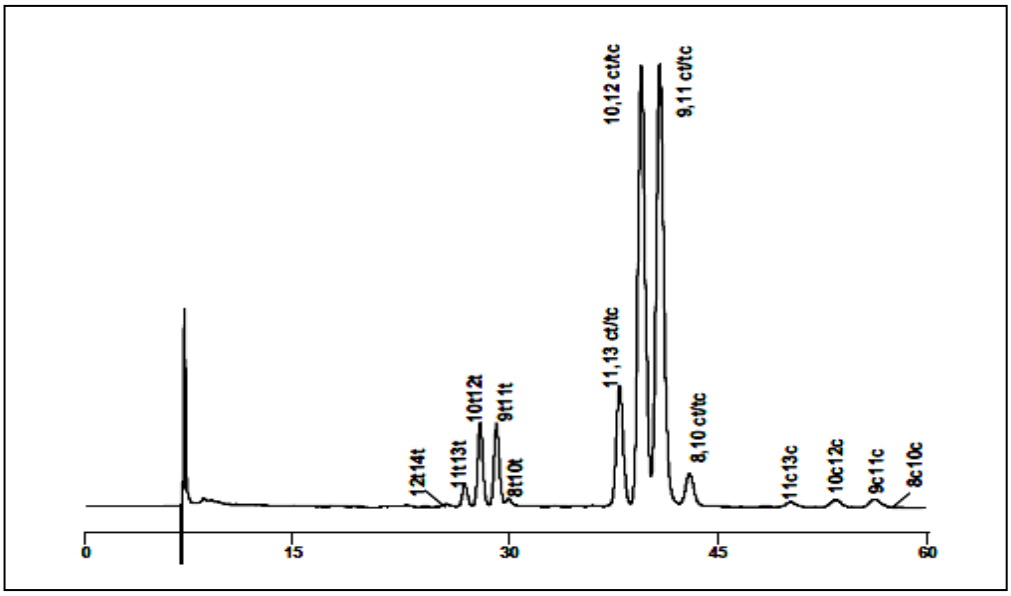
เทคนิค Ag^+-HPLC ถูกใช้ในการวิเคราะห์ CLA ครั้งแรกโดย Sehat et al. (1998) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งปริมาณ และคุณภาพ โดยตัวอย่าง CLA ที่นำมาวิเคราะห์จะถูกทำให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างคล้ายกับการวิเคราะห์ด้วย GC เทคนิค Ag^+-HPLC สามารถแยก CLA ทั้งในรูปกรดไขมันอิสระ และไทรกลีเซอร์ไรด์ที่มีตำแหน่งพันธะคู่ และรูปร่างที่แตกต่างกันได้ด้วยคอลัมน์ที่มีเฟสคงที่ ที่ประกอบด้วยไอออนของซิลเวอร์ที่ทำพันธะไอออนิกกับกรดฟีนิซัลโฟนิก (Phenylsulfonic acid) ที่เชื่อมอยู่กับซิลิกา เช่น ChromSpher lipids™ และ Nucleosil SA™ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ผสมระหว่างอะซีโทไนไทรล์กับเฮกเซน (0.1 acetonitrile: 99.99 hexane) ด้วยอัตราการไหลคงที่ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 233-234 นาโนเมตร ด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด Photodiode array detector (de la Fuente, Luna, and Juárez, 2006; Roach et al., 2002; Christie et al., 2007; Sehat et al., 1999) แต่อย่างไรก็ตามการใช้คอลัมน์เพียง 1 คอลัมน์จะไม่สามารถแยก CLA แต่ละไอโซเมอร์ได้อย่างสมบูรณ์ การใช้คอลัมน์มากกว่า 1 คอลัมน์ (2-6 คอลัมน์) จะเพิ่มประสิทธิภาพในการแยก CLA ทางการค้า และที่พบในธรรมชาติได้มากขึ้น (Sehat et al., 1999) รูปที่ 2.5 แสดงโครมาโทแกรมการแยก CLA ทางการค้าด้วยเทคนิค Ag^+-HPLC และคอลัมน์ ChromSpher lipids™ 2 คอลัมน์ต่อกัน โดยที่ CLA รูปร่างแบบ *trans*, *trans* จะถูกแยกออกมาเป็นลำดับแรก และตามด้วย CLA รูปร่าง *cis*, *trans* หรือ *trans*, *cis* และ *cis*, *cis* ตามลำดับ (รูปที่ 2.6)

2.3.3 วิธี Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)

เป็นวิธีที่สามารถบ่งชี้ถึงชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสารได้อย่างแม่นยำ โดยอาศัยการเปรียบเทียบรูปแบบ (Fingerprint) ของเลขมวล (Mass number) ของสารตัวอย่างนั้น ๆ กับข้อมูลที่มีอยู่ สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงปริมาณ (Quantitative analysis) และเชิงคุณภาพ (Qualitative analysis) ได้อย่างถูกต้อง และมีความไว (Sensitivity) สูง Mass Spectrometer เป็นเครื่องมือตรวจวัด (Detector) ที่ใช้ตรวจวัดองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่างโดยอาศัยกลไกคือ โมเลกุลขององค์ประกอบที่ถูกแยก

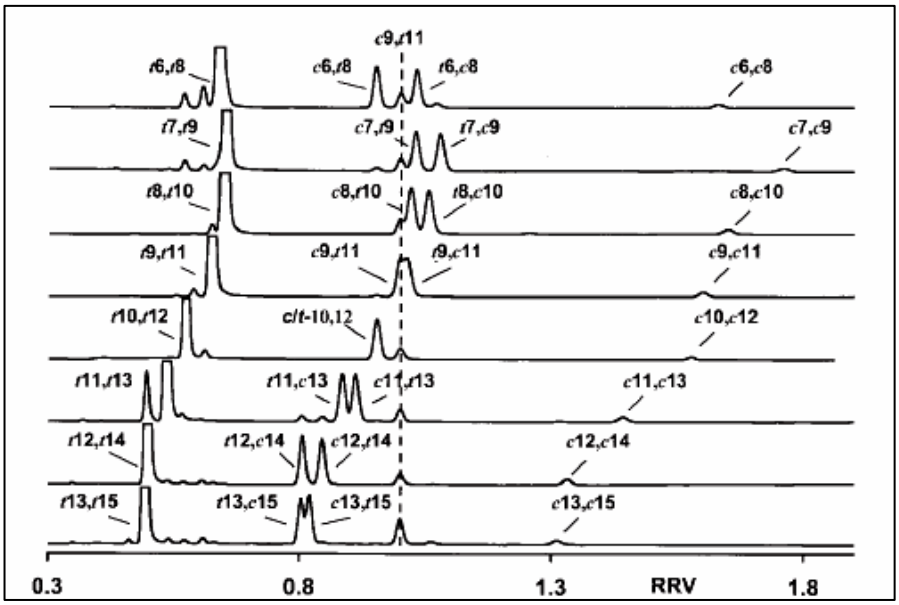
ออกมาจากสารตัวอย่างโดยเครื่อง GC นั้นจะถูกทำให้กลายเป็นไอออน (Ionization) ในสภาวะสุญญากาศ แล้วตรวจวัดออกมาเป็นเลขมวลเทียบกับข้อมูลอ้างอิงแล้วแปลผลออกมาเป็นชื่อขององค์ประกอบนั้น ๆ นอกจากนั้นสามารถนำเทคนิค GC-MS มาใช้ในการหามวลโมเลกุล (Molecular mass) โครงสร้างสารเคมี และองค์ประกอบของธาตุได้

GC-MS ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ CLA ทั้งในรูปกรดไขมันอิสระ และไทรกลีเซอร์ไรด์ เพื่อใช้ในการยืนยันไอโซเมอร์ของ CLA ที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค GC ซึ่งจะสามารถระบุตำแหน่งของพันธะคู่ และ รูปร่างของ CLA แต่ละไอโซเมอร์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งรูปร่าง *cis*, *trans* หรือ *trans*, *cis* ซึ่งเทคนิค GC และ Ag^{+}-HPLC จะไม่สามารถระบุได้ ตัวอย่าง CLA ที่วิเคราะห์ถูกเตรียมให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ Dimethyloxazolyne (DMOX) โดยทำปฏิกิริยากับ 2-Amino-2-metil-1-propanol หรือ 4-Methyl-1,1,2,4-triazolyn-3,5-diones (MTAD) รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะแมสสเปกตรัมของอนุพันธุ์ DMOX ของ CLA ไอโซเมอร์ *trans*-10, *cis*-12-18:2 ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS



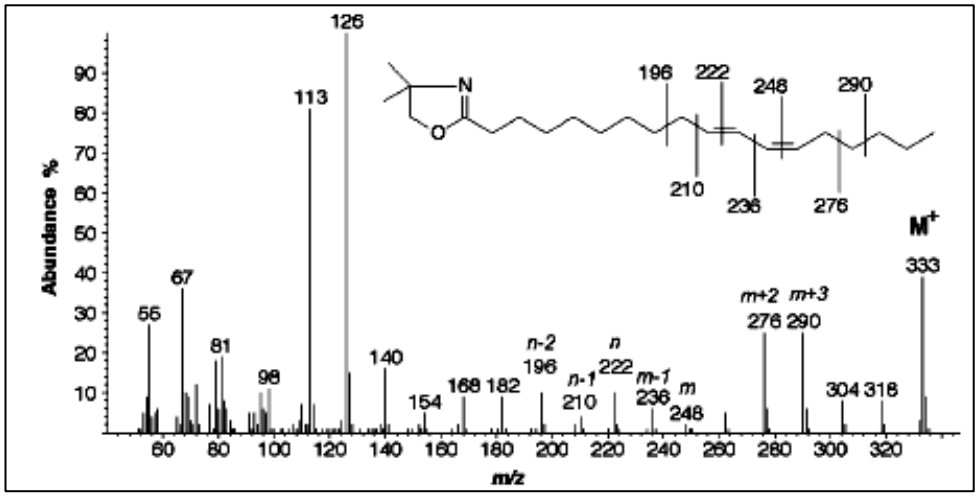
รูปที่ 2.5 โครมาโทแกรมการแยก CLA ทางการค้าที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Ag^{+}-HPLC และใช้คอลัมน์ ChromSpher lipids™ 2 คอลัมน์ต่อกัน โดยใช้อะซีโทไนไทรล์เข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร ในเฮกเซนเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัด CLA ที่ 234 นาโนเมตร

ที่มา: Christie, Sébédio, and Juanéda (2001)



รูปที่ 2.6 โครมาโทแกรมลำดับการแยกไอโซเมอร์ CLA ที่ตำแหน่ง 6, 8-13, 15 เมื่อมีโครงแบบที่แตกต่างกันเมื่อตรวจแยกด้วยเทคนิค Ag^{+}-HPLC (RRV: Relative retention volume คือปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการพาสารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์)

ที่มา: Delmonte, Kataoka, Corl, Bauman, and Yurawecz (2005)



รูปที่ 2.7 ลักษณะแมสสเปกตรัมของอนุพันธุ์ DMOX ของ CLA ไอโซเมอร์ *trans*-10, *cis*-12-18:2

ที่มา: Roach et al. (2002)

2.4 แบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria, LAB)

2.4.1 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแล็กติก

แบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria, LAB) จัดเป็นพวกโพรคาริโอต (Procaryotes) โดเมน (Domain) *Bacteria* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) มีรูปร่างเซลล์กลมหรือท่อน (Cocci or rods shape) ไม่สร้างสปอร์ (Non-spore-forming) ปกติไม่เคลื่อนที่ (Non-motile) โดยทั่วไปไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส และไม่มีระบบไซโตโครม สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่สามารถทนต่อสภาวะมีออกซิเจน (Aerotolerant) และทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้ (Acid- tolerant) ต้องการอาหารครบถ้วนในการเจริญ และผลิตกรดแล็กติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักน้ำตาล อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกลุ่มนี้บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียม (Pseudocatalase) ซึ่งขาดกลุ่มพอร์ไฟริน (Porphyrin group) และในสภาวะจำกัดสารอาหารกลุ่ม streptococci เช่น *Streptococcus bovis* มีการผลิตกรดแล็กติกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Axelsson, 2004) พบในสภาพธรรมชาติ ที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์ เช่น น้ำนม เนื้อสัตว์ ผัก และผลไม้

ในปัจจุบันแบคทีเรียกรดแล็กติกถูกจำแนก และจัดหมวดหมู่เป็น 21 สกุล (Genus) ได้แก่ *Aerococcus* (*A.*), *Lactobacillus* (*Lb.*), *Leuconostoc* (*Ln.*), *Pediococcus* (*P.*), *Streptococcus* (*S.*), *Enterococcus* (*E.*), *Lactococcus* (*Lc.*), *Vagococcus* (*V.*), *Carnobacterium* (*C.*), *Tetragenococcus* (*T.*), *Weissella* (*W.*), *Oenococcus* (*O.*), *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helcococcus*, *Ignavigranum*, และ *Lactosphaera* โดยพิจารณาตามสมบัติของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางสัณฐาน, ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่มีอาหาร และน้ำตาลสมบูรณ์ และมีปริมาณออกซิเจนอย่างจำกัด (Homofermentative หรือ hetero-fermentative), ระดับอุณหภูมิที่เจริญได้ (ที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส), ความสามารถในการเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือสูง (Salt tolerant, NaCl ร้อยละ 6.5 หรือ Extreme salt tolerant, NaCl ร้อยละ 18), การเจริญในสภาวะที่เป็นกรด (pH 4.4) หรือด่าง (pH 9.6), โครงแบบ (Configuration) ของกรดแล็กติกที่ผลิตขึ้น (L-, D-, DL-Lactic acid), การเจริญในสภาวะที่ความเข้มข้นของเอทานอลสูง (Ethanol tolerant) และยังอาศัย Chemotaxonomic markers เช่น ส่วนประกอบของกรดไขมันของเซลล์ และส่วนประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ เป็นต้น รวมถึงการหาลำดับนิวคลิโอไทด์ rRNA ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่จะสามารถจำแนก และจัดหมวดหมู่สกุลของแบคทีเรียกรดแล็กติกได้ถูกต้องที่สุด (Axelsson, 2004) โดยสกุลที่มีการรายงานว่าสามารถผลิต CLA จากกรดไขมันลิโนเลอิก หรือกรดไขมันไรซิโนเลอิกได้ ได้แก่

2.4.1.1 สกุล *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยา เนื่องจากความแตกต่างของ mol % G+C ภายในสกุลสูงคือระหว่างร้อยละ 32-53 (Axelsson, 1998) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะ

ทางสัณฐานของเซลล์ตั้งแต่ท่อนยาวจนถึงท่อนสั้นหรือ ทรงรี (Coccobacilli) ซึ่งมักมีการสร้างสายเซลล์ ขนาดเซลล์อยู่ในช่วง 0.5-1.2x1.0-10.0 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ แต่อาจพบการเคลื่อนที่ได้บ้างโดย Peritrichous flagella พบทั้ง Facultative anaerobes และ Microaerophiles บางสปีชีส์ทนต่อออกซิเจน หลายสปีชีส์เป็น Anaerobes ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน (Chemoorganotrophs) มีการเจริญดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5-5.8 อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส และเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความต้องการสารอาหารสมบูรณ์ทั้งกรดอะมิโน เปปไทด์ นิวคลิโอไทด์เบส วิตามิน แร่ธาตุ กรดไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ผลิตผลหลักที่ได้จากการหมักน้ำตาลและคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ อย่างน้อยร้อยละ 50 เป็นกรดแล็กติก ไม่รีดิวส์ไนเทรต ไม่ย่อยเจลาติน พบในแหล่งต่าง ๆ เช่น เยื่อเมือกของมนุษย์และสัตว์ พืช และน้ำทิ้ง เป็นต้น สกุล *Lactobacillus* ประกอบด้วย 56 สปีชีส์ เมื่อพิจารณาถึงการหมักเพื่อให้ได้มาซึ่งพลังงาน ได้มีการจัดกลุ่มของสมาชิกในสกุลนี้ได้เป็น 3 กลุ่ม (Hammes and Vogel, 1995) คือ

กลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส (Hexose) ได้เป็นกรดแล็กติกมากกว่าร้อยละ 85 โดยวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) โดยผลิตเอนไซม์ 1,6 Biphosphate-aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ฟอสโฟคีโทเลส (Phosphoketolase) จึงหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนทไม่ได้ ประกอบด้วย 17 สปีชีส์

กลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแล็กติกผ่านวิถี EMP มีการผลิตเอนไซม์ทั้งอัลโดเลส (Aldolase) และ ฟอสโฟคีโทเลส จึงหมักน้ำตาลเพนโทสได้ ประกอบด้วย 17 สปีชีส์

กลุ่ม Obligately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส และ เพนโทส ผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนท (Phosphogluconat) ได้ผลผลิตเป็น แล็กเทท, เอทานอล และ คาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณที่เท่ากัน ประกอบด้วย 22 สปีชีส์

2.4.1.2 สกุล *Enterococcus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ (Ovoid) จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายสั้น ๆ ไม่สร้างสปอร์ บางครั้งอาจพบการเคลื่อนที่ได้ จัดเป็น Facultative anaerobes และเป็น Chemoorganotrophs พลังงานได้มาจากการการหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ซึ่งสามารถผลิตกรดแล็กติกชนิดแอล (L(+)-Lactic acid) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส และไม่สร้างแก๊ส (Homofermentative) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ สามารถเจริญได้ที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 35-37 องศาเซลเซียส สามารถเจริญในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 6.5 บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียมได้ (Pseudo-catalase) ประกอบด้วย 5 กลุ่มสปีชีส์ ได้แก่ กลุ่ม *Enterococcus faecalis*, กลุ่ม *Ent. avium*, กลุ่ม *Ent. gallinarum* และกลุ่ม *Ent. cecorum* มี mol % G+C ระหว่างร้อยละ 37-40 (Devriese and Pot, 1995)

2.4.1.3 สกุล *Lactococcus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ (Ovoid) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 - 1 ไมโครเมตร จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายสั้น ๆ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ จัดเป็น Facultative anaerobes และเป็น Chemoorganotrophs พลังงานได้มาจากการหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ผลิตกรดแล็กติกชนิดแอลเป็นหลักจากการหมักกลูโคส และไม่สร้างแก๊ส ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส และออกซิเดส จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Mesophile สามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ต้องการสารอาหารที่สมบูรณ์ มักใช้เป็นกล้าเชื้อ (Starter culture) ในผลิตภัณฑ์นม พบในแหล่งต่าง ๆ เช่น ผักกาด ถั่ว หญ้า มันฝรั่ง น้ำนมดิบ ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, *Lc. lactis* ssp. *hordniae*, *Lc. garvieae*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* และ *Lc. piscium* มี mol % G+C ระหว่างร้อยละ 34-43 (Teuber, 1995)

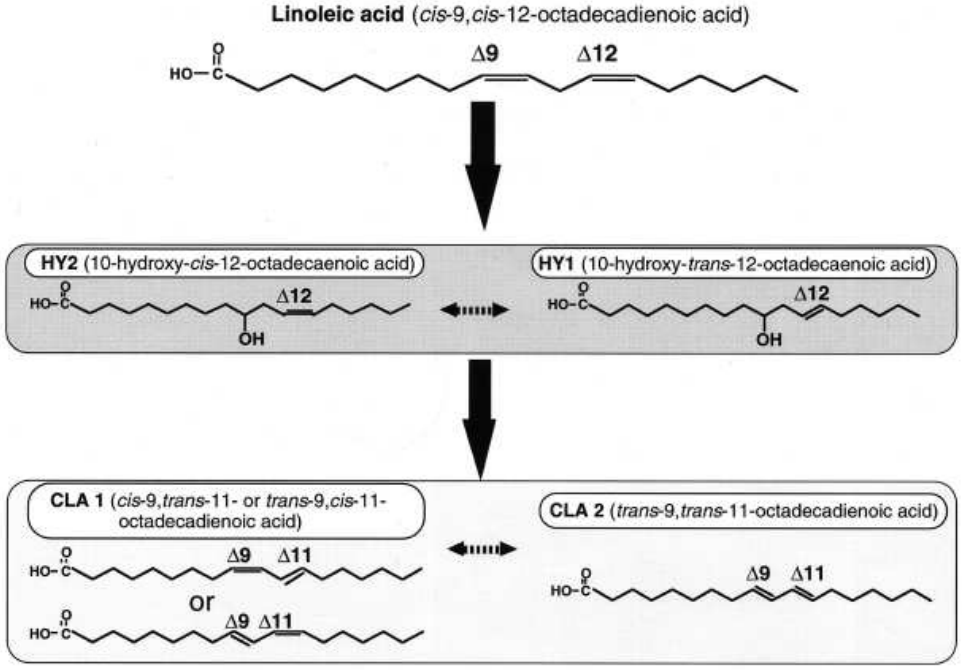
2.4.1.4 สกุล *Pediococcus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.36–1.43 ไมโครเมตร แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน ทำให้เกิดลักษณะ เฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส (Tetrad formation) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์จัดเป็น Facultative anaerobes, Microaerophiles บางสายพันธุ์เป็น Anaerobes และเป็น Chemoorganotrophs พลังงานได้มาจากการการหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ต้องการสารอาหารที่สมบูรณ์ ในสภาวะไม่มีอากาศจะผลิตกรดแล็กติกชนิดดีแอล (DL) หรือ L(+) จากการหมักกลูโคส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส พบได้ทั่วไปในพืชผักบางสปีชีส์ทำให้เบียร์และไวน์เสีย มี mol % G+C ระหว่างร้อยละ 34-44 (Simpson and Taguchi, 1995) ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici*, *P. damonosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, และ *P. pentosaceus* (Stiles and Hozapfel, 1997)

2.4.2 บทบาทของแบคทีเรียกรดแล็กติกต่อการผลิต CLA

แบคทีเรียกรดแล็กติกมีบทบาท และหน้าที่สำคัญต่อมนุษย์ ทั้งการเป็นโพรไบโอทิก (Probiotics) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้มนุษย์ และสัตว์ ซึ่งมีบทบาทอย่างยิ่งต่อการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย และเป็นแบคทีเรียหลักที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากการหมักด้วยกรดแล็กติก เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมัก ผัก ผลไม้ดอง และผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ปริมาณสูงจากการใช้น้ำตาลกลูโคส สร้างกลิ่นรสที่ดี รวมถึงบางสายพันธุ์สามารถผลิตแบคทีริโอซิน (Bacteriocin) ซึ่งจะช่วยในการถนอมอาหาร และคุณสมบัติที่สำคัญอย่างยิ่งคือ แบคทีเรียกรดแล็กติกปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Generally regarded as safe, GRAS) และจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียสำหรับอาหาร (Food grade bacteria) นอกจากนั้นยังนำกรดแล็กติกที่ผลิตได้ ไปใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตพอลิแล็กเทต ซึ่งเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เพื่อใช้แทนพลาสติกสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี

ยิ่งไปกว่านั้นมีการค้นพบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติก สามารถสร้าง CLA ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2

แบคทีเรียกรดแล็กติกส่วนใหญ่จะสร้าง CLA ได้จากกรดไขมันลิโนเลอิกเป็นหลัก แต่มีบางสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง CLA ได้จากกรดไขมันไรซิโนเลอิก เช่น *Lactobacillus plantarum* (Ando et al., 2004) โดยมีวิถีการสร้างแตกต่างกัน การสร้าง CLA จากกรดไขมันลิโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแล็กติกจะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรสที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ซึ่งกรดไขมันลิโนเลอิกที่เป็นสารตั้งต้นจะต้องอยู่ในรูปอิสระเท่านั้น แบคทีเรียกรดแล็กติกไม่สามารถสร้าง CLA ได้จากกรดไขมันลิโนเลอิกที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ และไทรกลีเซอร์ไรด์ การไอโซเมอร์ไรเซชันมีกลไกดังรูปที่ 2.8 คือ กรดไขมันลิโนเลอิกในรูปอิสระจะถูกเปลี่ยนไปเป็น 10-Hydroxy-18:1 ด้วยปฏิกิริยาการเติมน้ำ (Hydration) จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยากำจัดน้ำออก (Dehydration) ของ 10-Hydroxy-18:1 และเปลี่ยนตำแหน่งพันธะคู่ได้ CLA แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยน 10-Hydroxy-18:1 ไปเป็น CLA ไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*11-18:2 หรือ *trans*-9, *trans*-11-18:2 ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด (Ogawa et al., 2001) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง CLA จากกรดไขมันลิโนเลอิกมีรายละเอียดดังต่อไปนี้



รูปที่ 2.8 วิถีการเปลี่ยนรูปร่างของกรดไขมันลิโนเลอิกไปเป็น CLA โดย *Lactobacillus acidophilus*
ที่มา: Ogawa et al. (2001)

ตารางที่ 2.5 สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีศักยภาพในการผลิต CLA จากกรดไขมันลิโนเลอิกในรูปอิสระ

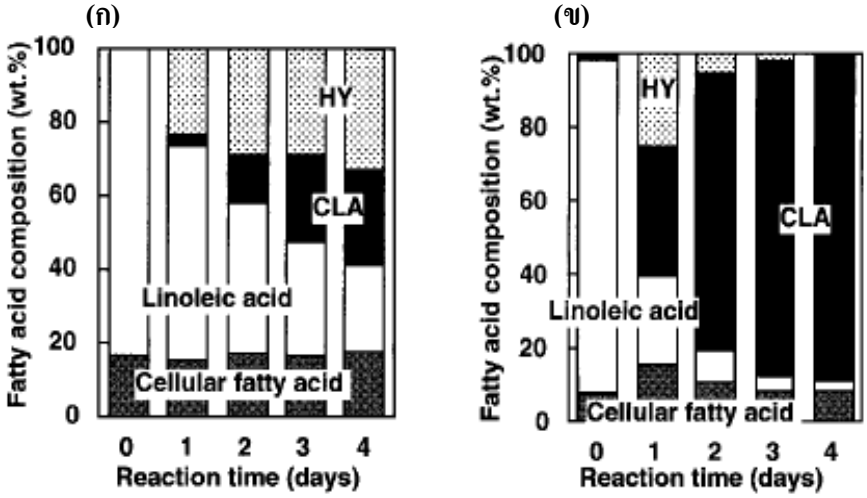
Strain	CLA content (μg/ml reaction mixture)		
	***c*9, *t*11-18:2**	***t*9, *t*11-18:2**	**Total CLA**
Enterococcus faecium AKU 1021	40	60	100
Pediococcus acidilactici AKU 1059	1000	400	1400
Lactobacillus acidophilus AKU 1137	850	650	1500
L. acidophilus IAM 10074	180	420	600
L. acidophilus AKU 1122	20	100	120
L. paracasei ssp. *paracasei* IFO 12004	50	150	200
L. paracasei ssp. *paracasei* JCM 1109	20	50	70
L. paracasei ssp. *paracasei* AKU 1142	40	30	70
L. paracasei ssp. *paracasei* IFO 3533	50	40	90
L. rhamnosus AKU 1124	690	720	1410
L. brevis IAM 1082	230	320	550
L. pentosus AKU 1148	50	30	80
L. pentosus IFO 12011	100	30	130
L. plantarum AKU 1138	100	350	450
L. plantarum AKU 1009a	250	3160	3410
L. plantarum JCM 8341	40	150	190
L. plantarum JCM 1551	100	1920	2020

ที่มา: Kishino et al. (2002)

Lin, Lin, and Lee (1999) นำแบคทีเรียกรดแล็กติกจำนวน 6 สายพันธุ์มาตรวจสอบผลของการเติมกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 1,000 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และระยะเวลาในการบ่มนาน 24 และ 48 ชั่วโมง ต่อการสร้าง CLA พบว่าสายพันธุ์ของแบคทีเรียมีผลต่อปริมาณการสร้าง CLA โดยที่ *Lactobacillus acidophilus* (CCRC14079) จะสร้าง CLA ได้สูงที่สุด 105.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในหางนมที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มนาน 24 ชั่วโมง จากการตรวจสอบปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติก จำนวน 17 สายพันธุ์โดย Kishino et al. (2002) พบว่า แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้าง CLA ได้แตกต่างกัน (ตารางที่ 2.5) โดยจะสร้างไอโซเมอร์หลักคือ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-9, *trans*-11-18:2 โดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a สร้าง CLA จากกรดไขมันลิโนเลอิก เข้มข้น

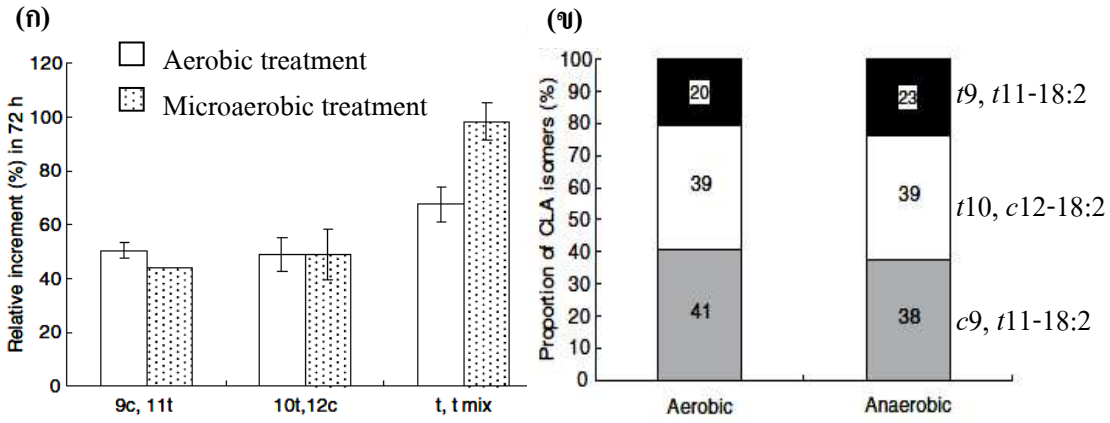
ร้อยละ 0.4 ได้สูงที่สุด 3,410 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-9, *trans*-11-18:2 ปริมาณ 250 และ 3,160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่า การใช้เซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเสริมกรดไขมันลิโนเลอิกร้อยละ 0.06 จะช่วยให้เกิดการสร้าง CLA มากขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ogawa et al. (2001) ดังแสดงในรูปที่ 2.9 การใช้เซลล์จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเสริมกรดไขมันลิโนเลอิกปริมาณร้อยละ 0.1 จะทำให้ *Lactobacillus acidophilus* AKU 1137 สร้าง CLA ได้สูงขึ้น โดยสามารถสร้าง CLA ได้ถึง 4.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-9, *trans*-11-18:2 ร้อยละ 67 และ 33 ตามลำดับ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่ากรดไขมันลิโนเลอิกในปริมาณเล็กน้อย จะกระตุ้นให้แบคทีเรียกรดแล็กติกสร้างเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรสได้มากขึ้น

การศึกษาเกี่ยวกับปริมาณออกซิเจนต่อปริมาณการสร้าง CLA โดย Kishino et al. (2002) และ Macouzet, Lee, and Robert (2009) พบว่า การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจน หรือออกซิเจนน้อยกว่าร้อยละ 1 หรือในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Aerobic, microaerobic or anaerobic conditions) ไม่ส่งผลต่อปริมาณ CLA ทั้งหมด แต่จะส่งผลต่อปริมาณแต่ละไอโซเมอร์ โดยที่การเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนเล็กน้อย และไม่มีออกซิเจนจะมีไอโซเมอร์ *trans*-9, *trans*-11-18:2 สูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนปกติ (รูปที่ 2.10)



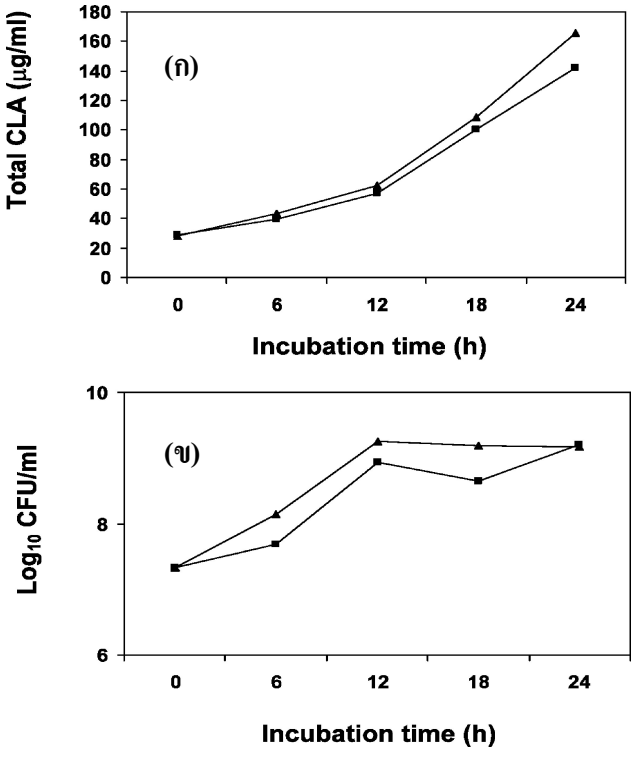
รูปที่ 2.9 ปริมาณการผลิต CLA ของ *Lactobacillus acidophilus* AKU 1137 จากกรดไขมันลิโนเลอิกเมื่อใช้เซลล์จากการเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่ไม่ได้เสริม (ก) และเสริมด้วยกรดไขมันลิโนเลอิกร้อยละ 0.1 (ข)

ที่มา: Ogawa et al. (2001)



รูปที่ 2.10 ปริมาณการสร้าง CLA แต่ละไอโซเมอร์ของ *Lactobacillus acidophilus* La-5 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจน ออกซิเจนเล็กน้อย และไม่มีออกซิเจน

ที่มา: Macouzet, Lee, and Robert (2009)



รูปที่ 2.11 ปริมาณการผลิต CLA (ก) และปริมาณเซลล์ (ข) ของ *Lactobacillus acidophilus* L1 (▲) และ *Lactobacillus casei* sp. *casei* E5 (■) ที่ทดสอบในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ที่มา: Alonso, Cuesta, and Gilliland (2003)

Alonso, Cuesta, and Gilliland (2003) ทดสอบการผลิต CLA ของแบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* ที่แยกได้จากลำไส้ของมนุษย์ ในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าปริมาณกรดไขมันลิโนเลอิกที่เหมาะสมในการผลิต CLA คือ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เวลาในการบ่ม 24 ชั่วโมง ซึ่ง *Lactobacillus acidophilus* L1 สามารถผลิต CLA ได้สูงสุด 131.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบการผลิต CLA ในหางนมเข้มข้น10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าจะได้ปริมาณ CLA ใกล้เคียงกันกับการเลี้ยงในอาหารเหลว MRS นอกจากนั้นยังมีผลการทดลองยืนยันว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกจะเริ่มผลิต CLA เมื่อเซลล์เจริญอยู่ในระยะท้ายของการเพิ่มจำนวน (Late log phase) จนถึงระยะคงที่ (Stationary phase) (รูปที่ 2.11) สอดคล้องกับการศึกษาของ Kishino et al. (2002) ผลของชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงต่อปริมาณการสร้าง CLA จากกรดไขมันลิโนเลอิกยังทดสอบโดย Van Nieuwenhove, Oliszewski, González, and Pérez Chaia (2007) ด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้ในผลิตภัณฑ์นม พบว่าแบคทีเรียที่ทดสอบทุกสายพันธุ์จะสร้าง CLA เมื่อเลี้ยงในน้ำนมกระบือไขมันเต็มได้มากกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่ง *Lactobacillus rhamnose* ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรสามารถผลิต CLA ได้สูงที่สุดโดยมีปริมาณการเปลี่ยนรูป (Conversion) เท่ากับร้อยละ 95.1 จากกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง แต่จำนวนเซลล์ และปริมาณการสร้าง CLA จะลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณกรดไขมันลิโนเลอิก ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่ากรดไขมันที่มากขึ้นจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

Lee, Hong, and Oh (2003) ศึกษาการเพิ่มปริมาณการผลิต CLA จากกรดไขมันลิโนเลอิกโดยการตรึงเซลล์ *Lactobacillus reuteri* ด้วยซิลิกาเจล พบว่าการตรึงเซลล์จะทำให้มีปริมาณการสร้าง CLA มากกว่าการใช้เซลล์อิสระถึง 5.5 เท่า ซึ่งในสภาวะที่เหมาะสม (เซลล์ 10 มิลลิกรัมต่อกรัมซิลิกาเจล, ค่าความเป็นกรด-ด่าง 10.5, อุณหภูมิบ่ม 55 องศาเซลเซียส, ระยะเวลา 1 ชั่วโมง) เซลล์ตรึงรูปจะสร้าง CLA ได้ 175 มิลลิกรัมต่อลิตร จากกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยบ่มใน 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-Propanediol) และบัฟเฟอร์ ซึ่งสอดคล้องกับ Lin, Hung, and Cheng (2005) ที่ทดสอบการสร้าง CLA โดยการใช้เซลล์ตรึงรูปด้วยโพลีอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide) และไคโทแซน (Chitosan) ของแบคทีเรีย *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* และ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งจะสามารถสร้าง CLA ได้ปริมาณมากกว่าเซลล์อิสระโดยในสภาวะที่เหมาะสม *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ที่ตรึงรูปด้วยโพลีอะคริลาไมด์จะสร้าง CLA ได้สูงที่สุด 12.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมกรดไขมันลิโนเลอิก จากกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมี *cis*-9, *trans*-11-18:2 เป็นไอโซเมอร์หลัก (6.83ไมโครกรัม) ในขณะที่เซลล์อิสระผลิตได้เพียง 0.054 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมกรดไขมันลิโนเลอิก

มีรายงานเกี่ยวกับการทดสอบการสร้าง CLA ด้วยเอนไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียกรดแล็กติก พบว่า เอนไซม์ที่สกัดได้จาก *Lactobacillus acidophilus* (CCRC14079) (Lin, Lin, and Wang, 2002) และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (C
CRC14009) (Lin, 2006) สามารถทำปฏิกิริยากับกรดไขมันลิโนเลอิกและเกิดโครงสร้าง CLA ได้ ซึ่งเอนไซม์จาก *Lactobacillus acidophilus* สามารถทำให้เกิด CLA มากที่สุด 1700 ไมโครกรัม จากกรดไขมันลิโนเลอิก 50 มิลลิกรัม (34 ไมโครกรัม CLA ต่อมิลลิกรัมกรดไขมันลิโนเลอิก) โดยมีไอโซเมอร์ *trans*-10, *cis*-12-18:2, *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-10, *trans*-12-18:2 เป็นไอโซเมอร์หลักตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการผลิตด้วยเอนไซม์ที่สกัดได้จาก *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* จึงเป็นข้อมูลที่ช่วยยืนยันได้ว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถผลิตเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรสได้

การศึกษาเกี่ยวกับการผลิต CLA จากน้ำมันที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำมันดอกทานตะวันที่มีอยู่เฉลี่ยร้อยละ 79 ด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก Kim and Liu (2002) ศึกษาปัจจัยในการผลิต CLA จากน้ำมันดอกทานตะวันด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติกในน้ำนมที่มีไขมันร้อยละ 25 พบว่า ปัจจัยในการผลิตประกอบไปด้วยสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ปริมาณเซลล์เริ่มต้น ความเข้มข้นของน้ำมันดอกทานตะวัน และระยะเวลาในการบ่ม ซึ่ง *Lactococcus lactis* IO-1 แสดงความสามารถในการผลิต CLA ได้สูงที่สุด 11 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมไขมัน เมื่อใช้น้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระยะเวลาบ่ม 12 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์เริ่มต้นอายุ 24 ชั่วโมงปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่เสริมด้วยกรดไขมันลิโนเลอิก 0.1 กรัมต่อลิตร ซึ่ง *Lactococcus lactis* IO-1 จะถูกยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้นมากกว่า 0.5 กรัมต่อลิตร Puniya, Chaitanya, Tyagi, and Singh (2008) ศึกษาความสามารถในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกลุ่ม lactobacilli ที่แยกได้จากกระเพาะหมักของวัวในอาหารที่เตรียมจากหางนม (Skim milk medium) ที่มีน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้นร้อยละ 0.25, 0.5 และ 1.0 พบว่า *Lactobacillus brevis* 02 สามารถสร้าง CLA ได้สูงที่สุด 10.53 มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน จากน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้นร้อยละ 0.25 ที่อุณหภูมิบ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แต่ที่สภาวะการบ่มเหมือนกัน *Lactobacillus casei* สามารถสร้าง CLA ได้สูงที่สุด 11.0 มิลลิกรัมต่อกรัมไขมันจากน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้นร้อยละ 1.0 (Puniya, Reddy, Kumar, and Singh, 2009) นอกจากนั้นยังมีรายงานการใช้น้ำมันเมล็ดอัลฟาลฟา (Alfalfa seed oil) ซึ่งมีกรดไขมันลิโนเลอิกประมาณร้อยละ 40 เป็นสารตั้งต้นในการผลิต CLA ด้วย *Lactobacillus acidophilus* 1.1854 โดยใช้เซลล์ที่ผ่านการล้างมาทดสอบการผลิต CLA ในน้ำนมไขมันเต็ม พบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณการผลิต CLA ประกอบด้วยปริมาณเซลล์แบคทีเรีย (ร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร) ระยะเวลาในการบ่ม (21 ชั่วโมง) ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (ร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH 6.4) อุณหภูมิที่ใช้

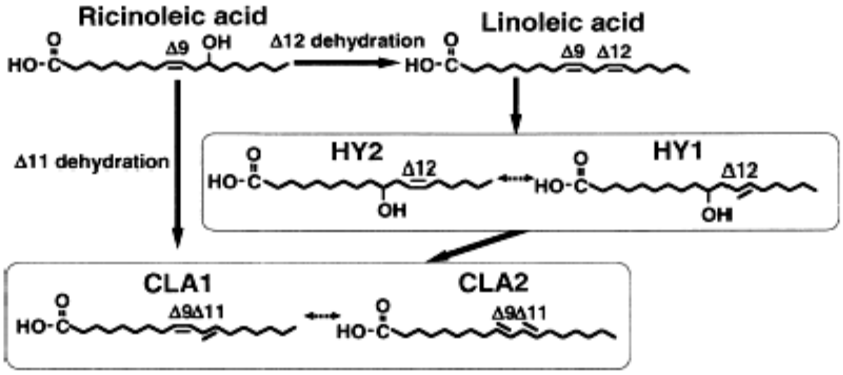
ในการบ่ม (37 องศาเซลเซียส) อายุเซลล์ที่นำไปใช้งาน (11 ชั่วโมง) และปริมาณ Alfalfa seed oil ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปใช้งาน (10 ไมโครลิตร) ในสภาวะที่เหมาะสมจะมีปริมาณการเปลี่ยนรูปของกรดไขมันลิโนเลอิกไปเป็น CLA ประมาณร้อยละ 50 (Dong and Qi, 2006)

แต่อย่างไรก็ตามการผลิต CLA จากกรดไขมันลิโนเลอิกด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติกจะได้ปริมาณน้อยเนื่องจากความเป็นพิษของกรดไขมันลิโนเลอิกที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงมีการศึกษาการเพิ่มปริมาณการผลิต CLA โดยพบว่าการใช้เซลล์ที่ผ่านการล้าง (Washed cells) ทำให้เกิดการสร้าง CLA ได้สูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เซลล์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยกรดไขมันลิโนเลอิกปริมาณเล็กน้อย ช่วยกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรสได้ นอกจากนั้นการเพิ่มการละลายของกรดไขมันลิโนเลอิกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วยสารก่ออิมัลชัน (Emulsifier) เช่น ทวีน 80 (Polyoxyethylene sorbitane monooleate, Tween 80®) และอัลบูมิน (Albumin) ช่วยเพิ่มการสัมผัสของเซลล์แบคทีเรียกับสับเสตรทได้มากขึ้น (Ogawa et al., 2005)

นอกจากการใช้กรดไขมันลิโนเลอิกเป็นสารตั้งต้น แบคทีเรียกรดแล็กติกยังสามารถผลิต CLA ได้จากกรดไขมันไรซิโนเลอิก (Ricinoleic acid, 12-Hydroxy-*cis*-9-18:1) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอน 18 อะตอม มีพันธะคู่หนึ่งพันธะที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 โดยมีรูปทรงแบบ *cis* และมีหมู่ไฮดรอกซี (-OH-) หนึ่งหมู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 12 พบมากในน้ำมันละหุ่งประมาณร้อยละ 88 สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแล็กติกที่พบว่าสามารถสร้าง CLA ได้สูงจากกรดไขมันชนิดนี้คือ *Lactobacillus plantarum* ประกอบด้วย 2 ไอโซเมอร์ คือ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-9, *trans*-11-18:2 ซึ่งเชื่อว่าเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรสที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเช่นเดียวกัน เนื่องจากโครงสร้างของกรดไขมันไรซิโนเลอิกคล้ายกับ 10-Hydroxy-18:1 ซึ่งเป็นสาร Intermediate ที่เกิดขึ้นระหว่างการเปลี่ยนกรดไขมันลิโนเลอิกไปเป็น CLA จึงมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดปฏิกิริยา Dehydration ได้เช่นกัน (Kishino, Ogawa, Ando, Omura, and Shimizu, 2002) การสร้าง CLA จากกรดไขมันไรซิโนเลอิกของแบคทีเรียกรดแล็กติกมีกลไก 2 กลไกหลัก คือ 1) การเปลี่ยนรูปจากกรดไขมันไรซิโนเลอิกไปเป็น CLA โดยตรง ด้วยปฏิกิริยา Δ11 Dehydration และ 2) การเปลี่ยนรูปจากกรดไขมันไรซิโนเลอิกไปเป็นกรดไขมันลิโนเลอิกด้วยปฏิกิริยา Δ12 Dehydration และเข้าสู่ขั้นตอนการเปลี่ยนไปเป็น CLA เช่นเดิม (Ogawa et al., 2005) ดังแสดงในรูปที่ 2.12

จากการศึกษาการสร้าง CLA จากกรดไขมันไรซิโนเลอิกของ Kishino et al. (2002) พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกจะสร้าง CLA ได้จากกรดไขมันไรซิโนเลอิกในรูปอิสระเท่านั้น ไม่สามารถสร้าง CLA ได้จากกรดไขมันไรซิโนเลอิกในรูปเอสเทอร์กับหมู่เมทิล และน้ำมันละหุ่งโดยตรง ซึ่ง *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a จะผลิต CLA ได้ถึง 412.5 มิลลิกรัมต่อกรัมกรดไขมันไรซิโนเลอิกอิสระ แต่ผลิตได้เพียง 7.5 มิลลิกรัมต่อกรัมไรซิโนเลอิกเอสเทอร์ และ 2.5 มิลลิกรัมต่อ

กรัมน้ำมันละหุ่ง เมื่อเติมเอนไซม์ไลเปสลงไปในระบบเกิดการย่อยได้กรดไขมันอิสระทำให้เกิดการสร้าง CLA ได้ถึง 285 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมันละหุ่ง ประกอบด้วย *cis*-9, *trans*-11-18:2 ปริมาณ 47.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมัน และ *trans*-9, *trans*-11-18:2 ปริมาณสูงถึง 237.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมัน นอกจากนั้น *Lactobacillus plantarum* JCM 1551 สามารถผลิต CLA จากน้ำมันละหุ่งที่มีการเติมเอนไซม์ไลเปส (Lipase M "Amano" 10) ได้สูงถึง 250 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมัน หรือคิดเป็นร้อยละ 25 ซึ่งจะมีปริมาณ *cis*-9, *trans*-11-18:2 ประมาณร้อยละ 46.67 และ *trans*-9, *trans*-11-18:2 ร้อยละ 53.33 (Ando et al., 2004) ส่วนการผลิต CLA จากกรดไขมันไรซิโนเลอิก อิสระด้วย *Lactobacillus plantarum* JCM 1551 ที่สภาวะที่เหมาะสมจะได้ CLA สูงที่สุด 705.88 มิลลิกรัมต่อกรัมกรดไขมันไรซิโนเลอิก ที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชั่วโมง หรือคิดเป็นการเปลี่ยนรูป (Conversion) ร้อยละ 70.59 ประกอบด้วย *cis*-9, *trans*-11-18:2 ร้อยละ 33.33 และ *trans*-9, *trans*-11-18:2 ร้อยละ 66.67 (Ando et al., 2003)



รูปที่ 2.12 วิถีการสร้าง CLA จากกรดไขมันไรซิโนเลอิกด้วย *Lactobacillus plantarum*
ที่มา: Kishino et al. (2002)

อย่างไรก็ตามการศึกษาการผลิต CLA จากกรดไขมันไรซิโนเลอิกด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติกนั้นมีข้อด้อยคือ มีการผลิตไอโซเมอร์ *trans*-9, *trans*-11-18:2 ปริมาณสูง ซึ่งเป็นไอโซเมอร์ที่ยังไม่มีงานวิจัยยืนยันว่ามีคุณสมบัติทางชีววิทยาที่เป็นประโยชน์หรือไม่ แต่ถือได้ว่าเป็นกรดไขมันชนิดทรานส์ (Trans fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีโทษหากบริโภคในปริมาณสูง เนื่องจากกรดไขมันชนิดทรานส์มีผลในการเพิ่มระดับ LDL และ ไทรกลีเซอร์ไรด์ในเลือด และมีผลในการลดระดับ HDL ในเลือด ซึ่งจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดเป็นโรคเกี่ยวกับเส้นเลือดหัวใจ (Coronary heart disease, CHD) เนื่องจาก LDL สามารถจับ และสะสมที่ผนังเส้นเลือดได้ ซึ่งเสี่ยงต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง และทำให้เกิดโรคเส้นเลือดหัวใจตีบได้ (Mozaffarian, Katan, Ascherio, Stampfer, and Willett, 2006)

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

3.1 แบคทีเรีย

3.1.1 แบคทีเรียกรดแล็กติกจำนวน 17 ไอโซเลท ที่ยังไม่ได้ระบุสายพันธุ์ แยกได้จากกระเพาะของปลาน้ำจืดที่มีการทดลองเกี่ยวกับการสร้าง CLA จากหน่วยวิจัยเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์และการใช้ประโยชน์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.1.2 สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีการทดสอบแล้วว่ามีศักยภาพในการสร้าง CLA จากกรดไขมันลิโนเลอิกบริสุทธิ์ จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338 และ *Lactococcus lactis* TISTR1401 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.1.3 แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไลเปส คือ *Seratia marcescens* จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

3.2.1 de Man Rogosa Sharpe (MRS) medium (Lab grade, Himedia Laboratory Pvt. Ltd., India) (ภาคผนวก 1.1)

3.2.2 Modified MRS medium (ภาคผนวก 1.2)

3.2.3 Lipase test agar (Tween 80 agar) (ภาคผนวก 1.3)

3.2.4 Modified Lipase test agar สูตร 1 และ 2 (ภาคผนวก 1.4 และ 1.5)

3.3 วัตถุดิบที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต CLA

3.3.1 น้ำมันดอกทานตะวัน (ตราองุ่น, บริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย) โดยมีส่วนประกอบตามฉลากโภชนาการของกรดไขมันลิโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2) เท่ากับ 9 กรัมต่อ 15 มิลลิลิตร และกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1) เท่ากับ 4 กรัมต่อ 15 มิลลิลิตร

3.3.2 น้ำมันถั่วเหลือง (ตราองุ่น, บริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย) โดยมีส่วนประกอบตามฉลากโภชนาการของกรดไขมันลิโนเลนิก (Linolenic acid, C18:3) เท่ากับ 1 กรัมต่อ 15 มิลลิลิตร กรดไขมันลิโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2) เท่ากับ 8 กรัมต่อ 15 มิลลิลิตร และกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1) เท่ากับ 3.5 กรัมต่อ 15 มิลลิลิตร

3.4 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้าง CLA จากน้ำมันดอกทานตะวันและ/หรือน้ำมันถั่วเหลือง

3.4.1 การเตรียมแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA

นำแบคทีเรียกรดแล็กติกจำนวน 17 ไอโซเลท และแบคทีเรียกรดแล็กติก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338 และ *Lactococcus lactis* TISTR1401 มาเพาะเลี้ยงให้ได้ระยะการเจริญของเซลล์ที่เป็น Vegetative cell โดยใช้อาหารเหลว MRS ในตู้บ่มแบบ ไร้ออกซิเจน (Anaerobic chamber) (SHEL LAB, Sheldon Manufacturing, Inc., U.S.A.) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบสภาพของเชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ด้วยวิธี Streak plate บันทึกลักษณะโคโลนี และศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรีย โดยศึกษาลักษณะ รูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีย้อมแบบแกรม (Gram stain) ของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งมีขั้นตอนคือ เตรียมรอย Smear ของแบคทีเรียอายุ 18-24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS บนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด ตรึงเซลล์ให้ติดแผ่นแก้วด้วยความร้อน หยดสี Crystal violet ให้ท่วมรอย Smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำเบา ๆ หยด Gram's iodine ให้ท่วมรอย Smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างรอย Smear ด้วยสารละลายแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 ประมาณ 5 วินาที ล้างด้วยน้ำทันที ย้อมทับรอย Smear ด้วยสี Safranin เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำ ทิ้งให้แห้ง ตรวจดูรูปร่าง โครงสร้าง การเรียงตัวของเซลล์ และการติดสีของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) (Olympus Model BX51TRF, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) และวัดขนาดเซลล์ด้วยโปรแกรม Image-Pro Plus Version 6.0.0.260: 1993-2006 (Media Cybernetics, Inc., Japan) จากนั้นเพิ่มจำนวนของเชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Simple streak บนอาหารแข็ง MRS และบ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มแบบไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA

3.4.2 การทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติก

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้รับการเพิ่มจำนวนบนอาหารแข็ง MRS ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกบริสุทธิ์ (Linoleic acid 99%, *cis*-9, *cis*-12-octadecadienoic acid (C18:2), Sigma Chemical Co., U.S.A.) 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในรูปอิมัลชัน (กรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย Tween 80® (Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate) (ACROS Organics, New Jersey, U.S.A.) เข้มข้นร้อยละ 1 (ภาคผนวก 1.7) เพื่อเพิ่มการละลายของกรดไขมันลิโนเลอิกในอาหารเหลว บ่มให้เกิดการเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มแบบไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณเซลล์เริ่มต้นด้วย Spectrophotometer (BIO-RAD, SmartSpec™ 3000, U.S.A.) และเติมลงในอาหารเหลว 2 ชนิด ได้แก่ อาหารเหลว MRS และอาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก MRS (Modified MRS broth) ปริมาตรอาหารเหลว 15 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมัน

ดอกทานตะวัน หรือน้ำมันถั่วเหลืองเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นอยู่ในช่วง 10^6-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มแบบไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (Viable cell) เริ่มต้นด้วยเทคนิค Spread plate และหลังจากครบ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณและไอโซเมอร์ของ CLA

3.4.3 การตรวจสอบปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตด้วยวิธี Standard plate count

นำอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อมาเจือจางแบบ Serial dilution ด้วยสารละลาย Butterfield's buffered phosphate diluent (ภาคผนวก 1.6) และใช้เทคนิค Spread plate บนอาหารแข็ง MRS ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มแบบไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนี (CFU ต่อมิลลิลิตร) ของแบคทีเรียที่พบ

3.4.4 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

ตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (MP220, Mettler-Toledo GmbH, CH8603 Schwerzenbach, Switzerland) ที่ได้ปรับเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.01 และ 7.0 อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส

3.4.5 การตรวจวิเคราะห์ CLA เชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ

วิธีการตรวจวิเคราะห์ CLA เชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ ดัดแปลงจากวิธีของ Alonso, Cuesta, and Gilliland (2003), Xu et al. (2008) และ Park et al. (2001) ซึ่งมีขั้นตอน และรายละเอียดดังต่อไปนี้

ก. การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ CLA ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

1. การสกัดไขมัน (Lipid extraction)

ดึงอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ 10 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรียออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall Legend Mach 1.6R Centrifuge, Thermo-Scientific, Thermo Electron LED GmbH, Germany) ที่ความเร็วรอบ 10,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำของเหลวส่วนใสมาเติม Heptadecanoic acid (Margaric acid, C17:0) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo., U.S.A.) ที่ละลายในเฮกเซน (Hexane) เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐานภายใน (Internal standard) จากนั้นเติมไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน สกัดไขมันโดยเติมเฮกเซนปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากันนาน 10 นาที นำสารละลายผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดึงสารละลายอินทรีย์ส่วนบนใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร

สกัดไขมันซ้ำอีกครั้งด้วยเฮกเซนปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายอินทรีย์ที่ได้มาผสมกันและทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์พร้อมปิดฝาสนิท

2. การย่อยไขมันให้อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระ (Lipid hydrolysis)

นำไขมันที่สกัดได้มาเติมเฮกเซนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ในเมทานอลเข้มข้น 1 นอร์มาล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พ่นด้วยแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์พร้อมปิดฝาสนิทเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เขย่าให้สารผสมกันและปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. การเตรียมกรดไขมันอิสระให้อยู่ในรูป Fatty acid methyl esters (FAMEs) (Methylation)

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2 มาเติมสารละลายโบรอนไทรฟรูออไรด์ในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 14 (14% Boron trifluoride in Methanol) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พ่นด้วยแก๊สไนโตรเจน ปิดฝาสนิทและเขย่าให้สารผสมกัน ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที โดยเขย่าทุก ๆ 5 นาที จากนั้นเติมน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสกัด FAMEs ด้วยเฮกเซนปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้วตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้นอย่างสมบูรณ์ ดึงของเหลวใสส่วนบนใส่หลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร สกัดซ้ำอีกครั้งด้วยเฮกเซนปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารละลายอินทรีย์ที่ได้มาผสมกัน และทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ เติมผงโซเดียมซัลเฟต (Anhydrous sodium sulphate, Na_2SO_4) ประมาณ 0.1 กรัม พร้อมปิดฝาสนิท เพื่อกำจัดความชื้นที่เหลือออก ละลาย FAMEs ด้วยเฮกเซนบริสุทธิ์ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชาขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิดฝาสนิท และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas chromatography

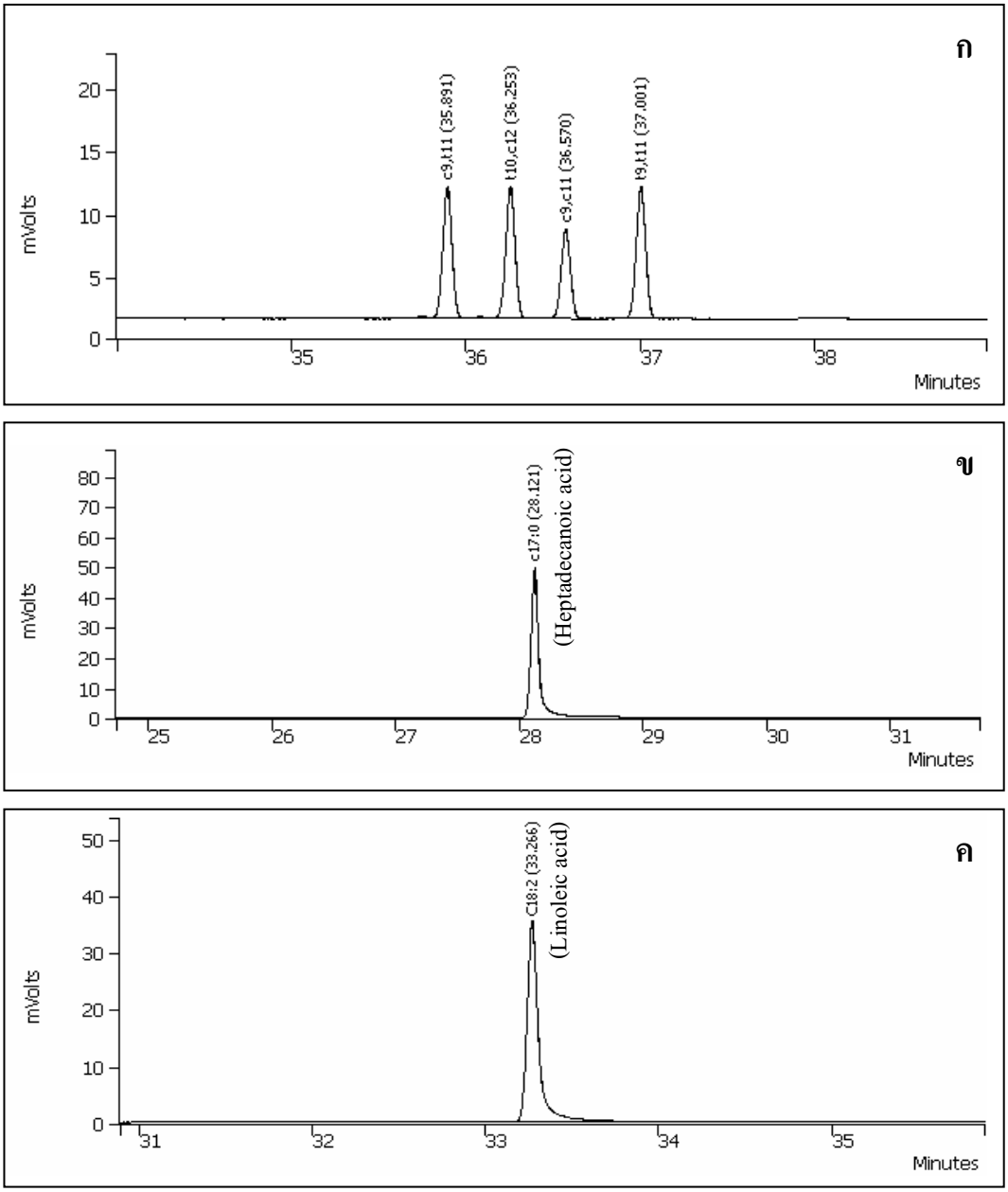
เนื่องจากการ Methylation โดยใช้สารละลายโบรอนไทรฟรูออไรด์ในเมทานอลเป็นวิธีการที่มีงานวิจัยยืนยันว่าจะทำให้เกิดการเปลี่ยนไอโซเมอร์ของ CLA จาก *cis*, *trans* เป็น *trans*, *trans* (Kramer et al., 1997) ดังนั้นจึงทดลองใช้โซเดียมเมทอกไซด์ (97% Sodium methoxide, CH_3NaO, Fluka, Fluka Chemie GmbH CH-9471 Buchs, Germany) ในเมทานอลในการทำปฏิกิริยา Methylation กรดไขมันในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ และ CLA ทางการค้า 2 ยี่ห้อ ได้แก่ ซี แอล เอ แอ็ดวานซ์ (CLA ADVANCE™) (บริษัท เมก้า ไลฟ์ไซแอ็นซ์ จำกัด, ประเทศไทย) และ ฟิกเกอร์ พลัส (Figger Plus) (บริษัท เอฟ.ซี.พี. จำกัด, ประเทศไทย) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Aldai et al. (2005) และ Park et al. (2001) เพื่อตรวจสอบปริมาณ CLA แต่ละไอโซเมอร์เปรียบเทียบกับการใช้สารละลายโบรอนไทรฟรูออไรด์ในเมทานอล ขั้นตอนและรายละเอียดวิธีการ Methylation และผลการพิสูจน์ดังแสดงในภาคผนวก 3 ซึ่งสรุปได้ว่า การใช้โซเดียมเมทอกไซด์ในเมทานอลมีข้อจำกัดคือไม่สามารถทำปฏิกิริยาทำปฏิกิริยา Methylation กับกรดไขมันที่อยู่ในรูปอิสระได้ ทำให้ไม่สามารถ

ตรวจวัดปริมาณ CLA และกรดไขมันในรูปอิสระที่มีในตัวอย่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารมาตรฐานภายใน (Heptadecanoic acid) ซึ่งโครมาโทแกรมของกรดไขมันที่สกัดได้จากตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อจากการทำ Methylation ด้วยโซเดียมเมทอกไซด์ในเมทานอลไม่แตกต่างจากการใช้สารละลายโบรอนไทรฟรูออไรด์ในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 14 ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่าการย่อยไขมันให้อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระ และทำปฏิกิริยา Methylation ไขมันด้วยสารละลายโบรอนไทรฟรูออไรด์ในเมทานอลที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปร่างไอโซเมอร์ ของ CLA

ข. การตรวจวัดเชิงปริมาณ และคุณภาพของ CLA ด้วยเทคนิค Gas chromatography

นำสารละลายกรดไขมันที่เตรียมได้มาวิเคราะห์หาปริมาณ และไอโซเมอร์ของ CLA ด้วยเครื่อง Gas chromatograph (CP-3800 Gas chromatograph, VARIAN, Chromatography Systems, Middleburg, Netherlands) โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัด (Detector) ชนิด Frame ionization (FID) และคอลัมน์แบบแคปปิลารี (Capillary column) สำหรับแยกกรดไขมัน (CP7420, WCOT Fused Silica, CP-Select CB for FAME, 100 m x 0.25 mm, 0.25 μm film thickness, VARIAN, U.S.A.) ระบุตำแหน่งไอโซเมอร์ของ CLA โดยเปรียบเทียบระยะเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ (Retention time) กับสารมาตรฐาน CLA (Methylated CLA standard) ประกอบด้วย *cis*-9, *trans*-11-C18:2, *trans*-10, *cis*-12-C18:2, *cis*-9, *cis*-11-C18:2, และ *trans*-9, *trans*-11-C18:2 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A.) ดังรูปที่ 3.1 และใช้สารมาตรฐานภายใน Heptadecanoic acid เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเฮกเซน ในการคำนวณปริมาณ CLA แต่ละไอโซเมอร์ ซึ่งใช้สภาวะในการวิเคราะห์ CLA ดังต่อไปนี้

- อุณหภูมิส่วนฉีดสาร (Injector temperature) : 240 องศาเซลเซียส
- อัตราส่วนของสารที่เข้าคอลัมน์กับส่วนที่ระบายออก (Split ratio) : 1 ต่อ 50
- อุณหภูมิของคอลัมน์ (Column temperature) : ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เพิ่มอุณหภูมิจนถึง 175 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงไว้นาน 15 นาที จึงเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 215 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงไว้ 12 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 240 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงไว้ 10 นาที รวมระยะเวลาในการวิเคราะห์เท่ากับ 54.75 นาที
- อุณหภูมิของอุปกรณ์ตรวจวัด (Detector temperature) : 250 องศาเซลเซียส
- แก๊สพา (Carrier gas) : ฮีเลียม อัตรา 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Injection volume) : 1 ไมโครลิตร



รูปที่ 3.1 โครมาโทแกรมแสดงระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสารมาตรฐาน CLA (ก), สารมาตรฐานภายใน (C17:0) (ข) และสารมาตรฐานกรดไขมันลิโนเลอิก (ค) ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ CP7420, WCOT Fused Silica, CP-Select CB for FAME

3.5 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียกรดแล็กติก

นำแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้งหมด มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยนำเชื้อบริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารแข็งทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปส (Lipase test agar หรือ Tween 80 agar) และ อาหารแข็งทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสสูตรดัดแปลงสูตร 1 และ 2 (Modified Lipase test agar) ด้วยเทคนิค Streak plate บ่มให้แบคทีเรียเกิดการเจริญในตู้บ่มแบบไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยสังเกตการเกิดตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนี (Halo formation) ที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร เนื่องจากกรดไขมันอิสระที่ได้จากไขมันถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรีย จับรวมตัวกับเกลือแคลเซียม เกิดการตกตะกอนอยู่รอบ ๆ โคโลนี เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียกรดแล็กติกกับแบคทีเรีย *Seratia marcescens* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้เป็นปกติ

3.6 การตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือก

3.6.1 การศึกษาขนาดหยดน้ำมันในระบบอิมัลชันที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA

3.6.1.1 การเตรียมน้ำมันให้อยู่ในรูปอิมัลชันและการวัดขนาดหยดน้ำมัน

เตรียมน้ำมันให้อยู่ในรูปอิมัลชันที่มีขนาดหยดน้ำมัน 3 ระดับ โดยใช้สารก่ออิมัลชัน (Emulsifier agent) 2 ชนิดได้แก่ทวีน 80 (Tween 80®) (ACROS Organics, New Jersey, U.S.A.) และสแปน 80 (Span 80®) (Sorbitan monooleate) (Sigma -Aldrich Co., St. Louis, MO., U.S.A.) โดยมีวิธีการเตรียมดังต่อไปนี้

ก. อิมัลชันที่มีขนาดหยดน้ำมันระดับที่ 1 ประกอบด้วย

น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน หรือน้ำมันถั่วเหลือง	1.0	กรัม
Tween 80®	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	98.0	กรัม

ละลาย Tween 80® ด้วยน้ำกลั่น ในขวดฝาเกลียว ทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมน้ำมันแล้วเขย่าอย่างแรงจนเกิดอิมัลชัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ข. อิมัลชันที่มีขนาดหยดน้ำมันระดับที่ 2 ประกอบด้วย

น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน หรือน้ำมันถั่วเหลือง	20.0	กรัม
Tween 80®	5.04	กรัม
Span 80®	3.96	กรัม
น้ำกลั่น	71.0	กรัม

ชั่งน้ำมัน และสารก่ออิมัลชันทั้ง 2 ชนิดใส่บีกเกอร์ นำไปให้ความร้อนโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ปั่นกวนด้วยแท่งแม่เหล็กจนของเหลวผสมมีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมน้ำลงของเหลวผสมในอัตรา 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยคงอุณหภูมิไว้ที่ 70 องศาเซลเซียส ตลอดการเติมน้ำกลั่น เก็บอิมัลชันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Liu, Sun, Li, Liu, and Xu, 2006)

ค. อิมัลชันที่มีขนาดหยดน้ำมันระดับที่ 3 ประกอบด้วย

น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน หรือน้ำมันถั่วเหลือง	20.0	กรัม
Tween 80®	5.04	กรัม
Span 80®	3.96	กรัม
น้ำกลั่น	71.0	กรัม

เตรียมอิมัลชันเช่นเดียวกันกับการทำอิมัลชันในข้อ 3.6.1.1ข แต่เพิ่มปริมาณอิมัลชันเป็น 300 กรัม และใช้เครื่องกวนผสมสาร(Overhead stirrer, RW 20 digital, IKA®-WERKE GMBH & CO.KG, Germany) ที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที เมื่อได้อิมัลชันสีขาวขุ่น นำไปลดขนาดหยดน้ำมันขณะร้อนด้วยเครื่องลดขนาดอนุภาคเม็ดไขมันระบบสองระดับความดัน (Homogenizer, 15 MR-8TA, APV Gaulin, INC., U.S.A.) โดยระดับความดันที่ 1 เท่ากับ 500 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และความดันระดับที่ 2 เท่ากับ 5,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เก็บอิมัลชันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วัดขนาดหยดน้ำมันตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Segall and Goff (1999) โดยนำตัวอย่างอิมัลชันมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนตัวอย่างอิมัลชันต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 0.5:100 จากนั้นนำไปวัดขนาดหยดน้ำมันด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาคไขมัน (Laser particle size analyzer, Mastersizer S, Malvern Instruments, Ltd., U.K.) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่าเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยแบบ $d_{3,2}$ (Surface-weighted mean diameter)

3.6.1.2 การทดสอบขนาดหยดน้ำมันที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA

ก. การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก

เตรียมกล้าเชื้อโดยเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ให้ได้ระยะการเจริญของเซลล์ในช่วง Late log phase ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่เสริมด้วยกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มให้เกิดการเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มแบบไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเซลล์เริ่มต้นโดยการวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 571 นาโนเมตร และเทียบหาปริมาณเซลล์โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก 2 รูปที่ ผ1) เจือจางให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วยอาหารเหลว Modified MRS

ข. การทดสอบขนาดหยดน้ำมันที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือก

เตรียมอาหารเหลว Modified MRS ปลอดเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0±0.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เตรียมอิมัลชันให้ปลอดเชื้อโดยอิมัลชันที่มีหยดน้ำมัน 0.83 และ 0.64 ไมโครเมตร กรองผ่านตัวกรองที่มีความละเอียด 0.45 และ 0.2 ไมโครเมตร ตามลำดับ ซึ่งจะไม่ทำให้ขนาดหยดน้ำมันเปลี่ยนแปลง เติมอิมัลชันที่เตรียมได้ลงในอาหารเหลวโดยให้มีความเข้มข้นของน้ำมันเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่เจือจางแล้วข้างต้นปริมาณ (Inoculum size) ร้อยละ 1 โดยปริมาตร เลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญในตู้บ่มแบบไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลองสองซ้ำ ตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณและไอโซเมอร์ของ CLA ตามวิธีการที่ระบุในข้อ 3.4.3, 3.4.4 และ 3.4.5

3.6.2 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันดอกทานตะวันและน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกบริสุทธิ์ตามวิธีการที่ระบุในข้อ 3.6.1.2ก และเตรียมอาหารเช่นเดียวกันกับที่ระบุในข้อ 3.6.1.2ข โดยใช้ขนาดหยดน้ำมันในระบบอิมัลชันที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA เป็นวัตถุดิบ และมีความเข้มข้นของน้ำมันเท่ากับ 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมกล้าเชื้อปริมาณร้อยละ 1 โดยปริมาตร เลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญในตู้บ่มแบบไร้ออกซิเจน และตรวจวัดปริมาณต่าง ๆ ตามวิธีการที่ระบุในข้อ 3.4.3, 3.4.4 และ 3.4.5

3.6.3 การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกบริสุทธิ์ตามวิธีการที่ระบุในข้อ 3.6.1.2ก เตรียมอาหารเหลว Modified MRS ปลอดเชื้อให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0±0.2, 6.5±0.2, 6.8±0.2, 7.0±0.2 และ 7.5±0.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำมันดอกทานตะวันในระบบอิมัลชันที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA โดยให้มีความเข้มข้นของน้ำมันเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมกล้าเชื้อปริมาณร้อยละ 1 โดยปริมาตร เลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญในตู้บ่มแบบไร้ออกซิเจน และตรวจวัดปริมาณต่าง ๆ ตามวิธีการที่ระบุในข้อ 3.4.3, 3.4.4 และ 3.4.5

3.6.4 การศึกษาอุณหภูมิบ่มที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA

ทำการเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกบริสุทธิ์ และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการที่ระบุในข้อ 3.6.1.2ก และ 3.6.1.2ข ตามลำดับ เติมน้ำมันดอกทานตะวันในระบบอิมัลชันที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยให้มีความเข้มข้นของน้ำมันเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมกล้าเชื้อปริมาณร้อยละ 1 โดยปริมาตร บ่มในโถที่มีสารดักจับออกซิเจน (AnaeroGen™, OXOID Ltd., Basingstock, Hampshire, England) ในตู้บ่มอุณหภูมิ 25, 30, 35, 37

และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลองสองซ้ำ และตรวจวัดปริมาณต่าง ๆ ตามวิธีการที่ระบุในข้อ 3.4.3, 3.4.4 และ 3.4.5

3.6.5 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกบริสุทธิ์ และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการที่ระบุในข้อ 3.6.1.2ก และ 3.6.1.2ข ตามลำดับ เติมน้ำมันดอกทานตะวันในระบบอิมัลชันที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยให้มีความเข้มข้นของน้ำมันเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมกล้าเชื้อให้มีปริมาณต่าง ๆ กัน คือ ร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 โดยปริมาตร บ่มให้แบคทีเรียกรดแล็กติกเกิดการเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มแบบไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลองสองซ้ำ และตรวจวัดปริมาณต่าง ๆ ตามวิธีการที่ระบุในข้อ 3.4.3, 3.4.4 และ 3.4.5

3.7 การทดสอบการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกแบบกล้าเชื้อผสม

ตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของปริมาณ CLA เมื่อใช้กล้าเชื้อผสมเทียบกับการใช้เชื้อเดี่ยว โดยเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกบริสุทธิ์ และเตรียมอาหารเหลวปลอดเชื้อตามวิธีการที่ระบุในข้อ 3.6.1.2ก และ 3.6.1.2ข ตามลำดับ เติมน้ำมันดอกทานตะวันในระบบอิมัลชันที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยให้มีความเข้มข้นของน้ำมันเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเติมกล้าเชื้อแต่ละเชื้อโดยใช้ปริมาณที่เหมาะสมในการสร้าง CLA ซึ่งพิจารณาจากผลการทดลองในข้อ 3.6.5 เลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญในตู้บ่มแบบไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลองสองซ้ำ และตรวจวัดปริมาณต่าง ๆ ตามวิธีการที่ระบุในข้อ 3.4.3, 3.4.4 และ 3.4.5

3.8 ศึกษาการผลิต CLA ในระบบถังหมักแบบเป็นชุด (Batch fermentation) ในระดับห้องปฏิบัติการ

ศึกษาปริมาณการสร้าง CLA ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่แสดงความสามารถในการสร้าง CLA ได้สูงที่สุดในระบบถังหมักแบบเป็นชุดขนาด 5 ลิตร โดยมีขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อดังต่อไปนี้

3.8.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกอายุ 18 ชั่วโมง ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่เสริมด้วยกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบปริมาณเซลล์เริ่มต้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 571 นาโนเมตร และเทียบหาปริมาณเซลล์โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐาน

(ภาคผนวก 2 รูปที่ ผ1) จากนั้นเตรียมกล้าเชื้อให้มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^6-10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วยอาหารเหลว Modified MRS ซึ่งพร้อมเติมลงในถังหมัก

3.8.2 การเลี้ยงเชื้อในระบบถังหมัก

เตรียมอาหารเหลว Modified MRS ปริมาตร 5 ลิตร บรรจุลงในถังหมัก ทำให้ระบบทั้งหมดปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นต่อถังหมักเข้ากับระบบถังหมัก (Biostat® Bplus, Type 8843414, Sartorious BBI Systems GmbH, Germany) เติมน้ำมันดอกทานตะวันในระบบอิมัลชันปลอดเชื้อคือกรองผ่านตัวกรองความละเอียด 0.2 ไมโครเมตร ซึ่งจะไม่ทำให้ขนาดหยดน้ำมันเปลี่ยนแปลง พร้อมกับเติมกล้าเชื้อที่เตรียมข้างต้นในปริมาณที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA เลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญในสภาวะปิดไม่มีการถ่ายเทของอากาศ เพื่อลดปริมาณออกซิเจนในระบบ กวนอาหารเหลวด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ตั้งค่าอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA ของเชื้อที่คัดเลือกตลอดการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 โมลาร์ปลอดเชื้อในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ปั่นกวนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ปริมาณและไอโซเมอร์ของ CLA ในแต่ละช่วงเวลาตามวิธีการที่ระบุในข้อ 3.4.3 และ 3.4.5

3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ ANOVA และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 13 (SPSS Inc., Illinois, U.S.A.)

3.10 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

ห้องปฏิบัติการเคมีอาหาร ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 หน่วยวิจัยเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์และการใช้ประโยชน์ และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2 และฝ่ายวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

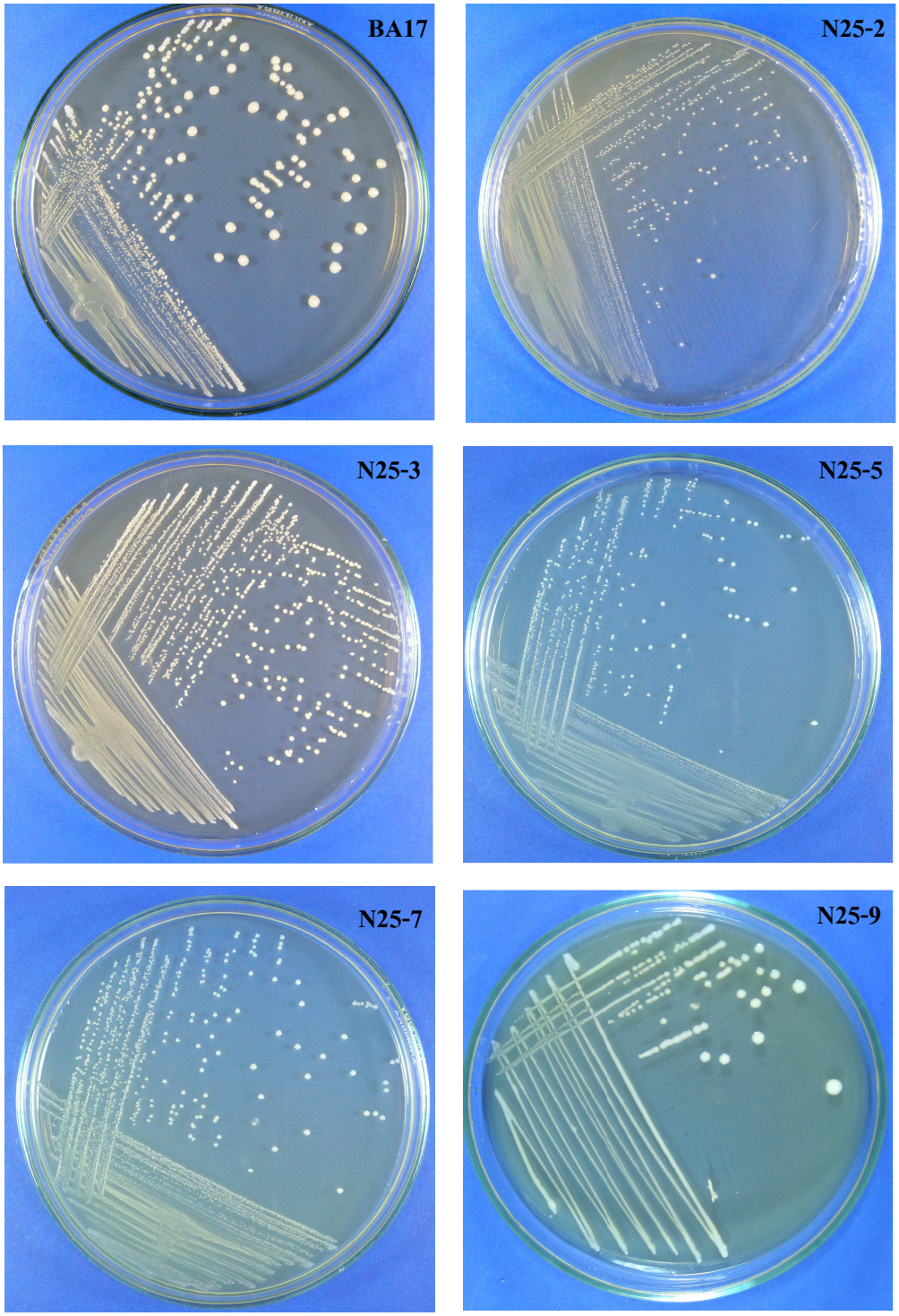
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้าง CLA จากน้ำมันดอกทานตะวันและ/หรือน้ำมันถั่วเหลือง

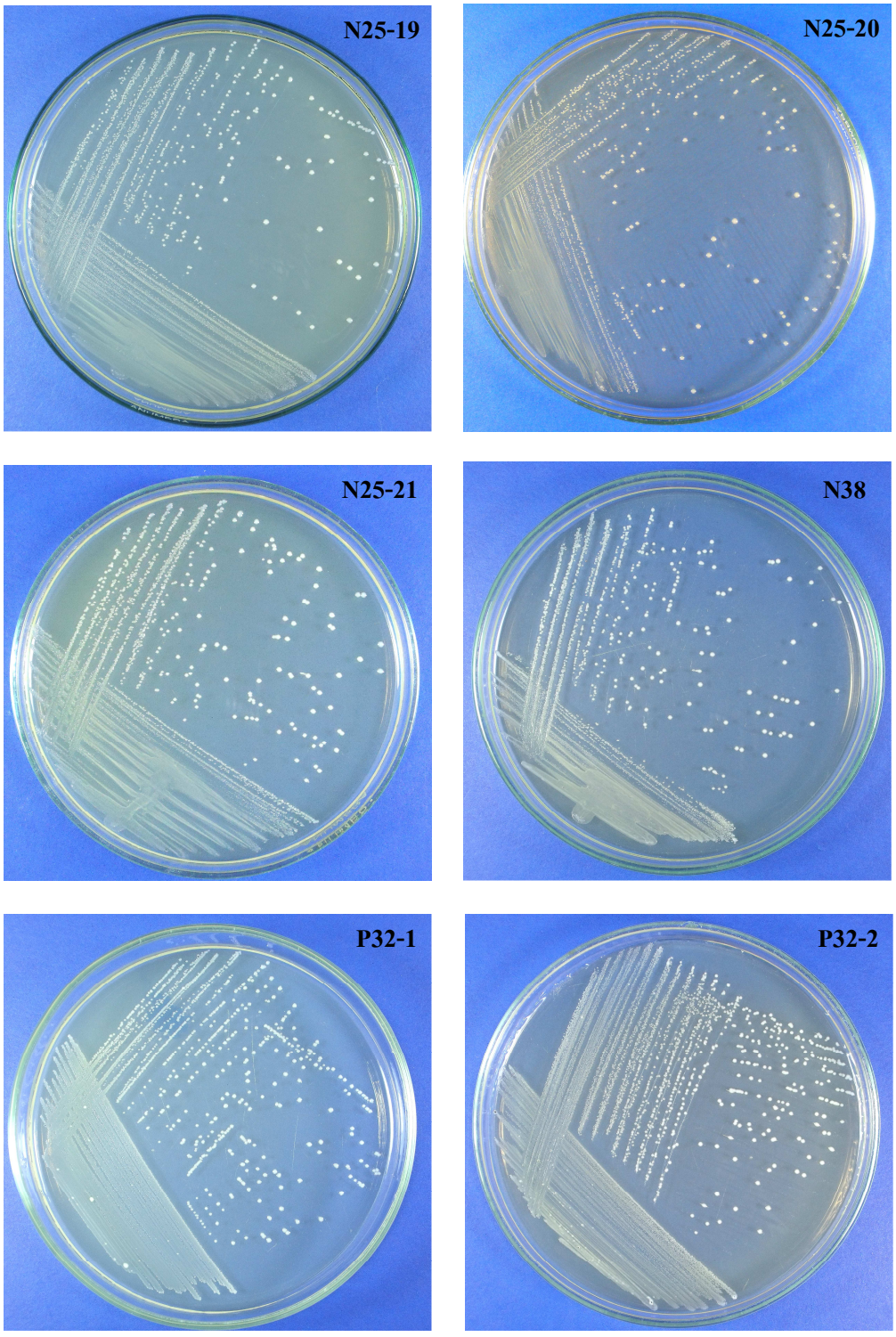
แบคทีเรียกรดแล็กติกจำนวน 17 ไอโซเลท แยกได้จากกระเพาะปลาน้ำจืดที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการสร้าง CLA ในเนื้อปลา และแบคทีเรียกรดแล็กติก 2 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338 และ *Lactococcus lactis* TISTR1401 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้มีการทดสอบแล้วว่ามีศักยภาพในการสร้าง CLA จากกรดไขมันลิโนเลอิกบริสุทธิ์ ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA จากน้ำมันดอกทานตะวันและน้ำมันถั่วเหลืองที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกอยู่ประมาณ 0.65 และ 0.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน ตามลำดับ ซึ่งคำนวณจากปริมาณที่ระบุในฉลากโภชนาการ และการหาความหนาแน่นของน้ำมันทั้งสองชนิดโดยมีค่าเท่ากับ 0.916 กรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้าง CLA ได้สูงโดยสร้างไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-10, *cis*-12-18:2 เป็นหลัก นำแบคทีเรียทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ตรวจสอบสภาพของเชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ด้วยวิธี Streak plate บนอาหารแข็ง MRS และศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรีย รูปที่ 4.1 แสดงตัวอย่าง ลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ และตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยมีแบคทีเรียแกรมบวกทั้งรูปร่างกลม รูปไข่ (Ovoid) และแท่ง และมีการจัดเรียงตัวทั้งแบบเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ และสายสั้น ๆ

การทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA เริ่มจากนำเชื้อบริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่เสริมด้วยกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรส จนมีอายุของเซลล์อยู่ในช่วง Late log phase ประมาณ 18-20 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะการเจริญที่งานวิจัยที่ผ่านมาระบุว่าเป็นช่วงที่มีการสร้าง CLA เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Alonso, Cuesta, and Gilliland, 2003) นำแบคทีเรียที่เลี้ยงได้เติมลงในอาหารเหลวทดสอบ 2 ชนิด ได้แก่ อาหารเหลว MRS (ภาคผนวก 1.1) และ อาหารเหลว Modified MRS (ภาคผนวก 1.2) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณการสร้าง CLA ในอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ กับอาหารที่มีสารอาหารอย่างจำกัด โดยในอาหารทั้งสองชนิดจะมีน้ำมันดอกทานตะวัน หรือน้ำมันถั่วเหลืองเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้ำมันที่เติมลงไปนั้นจะอยู่ในรูปอิมัลชันโดยใช้ทวีน 80 (Tween 80®) เข้มข้นร้อยละ 1 เป็นสารก่ออิมัลชันเพื่อให้น้ำมันละลายในอาหารเหลวสัมผัสกับเซลล์แบคทีเรียได้มากขึ้น ผลการ

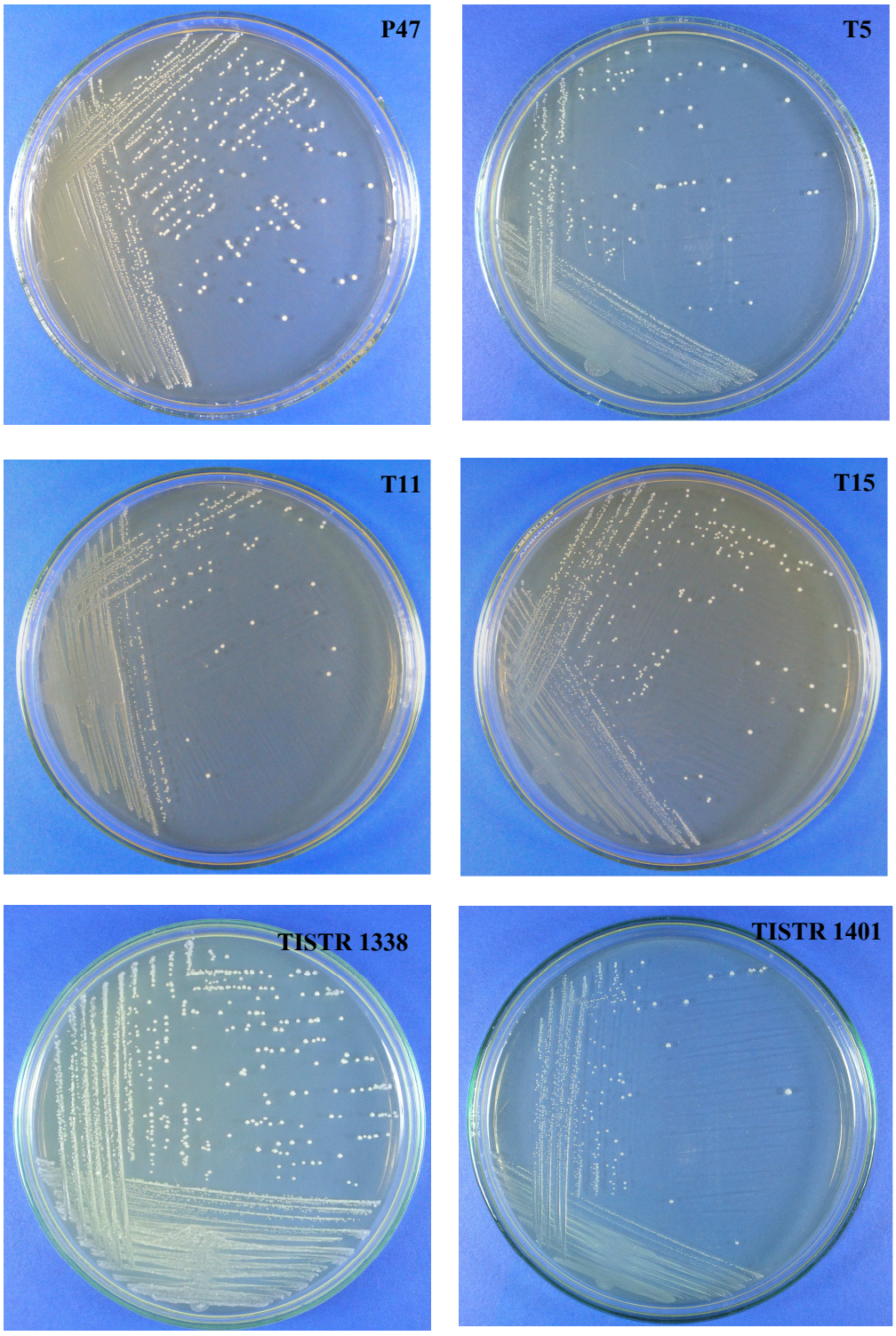
ทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำมันดอกทานตะวันและน้ำมันถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบแสดงในตารางที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวทดสอบ MRS จะเจริญเพิ่มจำนวนได้มาก โดยพิจารณาจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงมากหลังบ่มครบ 48 ชั่วโมง แต่มีการสร้าง CLA ในปริมาณที่ต่ำและมีแบคทีเรียหลายไอโซเลทที่ไม่สร้าง CLA ซึ่งแตกต่างจากการเลี้ยงในอาหารเหลวทดสอบ Modified MRS อย่างชัดเจนดังตารางที่ 4.4 และ 4.5 โดยพบว่าแบคทีเรียมีการเจริญน้อยกว่า แต่ตรวจพบการสร้าง CLA ในปริมาณที่มากกว่าและตรวจพบทุกไอโซเลท ทั้งการใช้น้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลืองเป็นสารตั้งต้น ยกเว้นไอโซเลท T15 ที่ไม่สร้าง CLA จากน้ำมันถั่วเหลือง นอกจากนั้นมีแบคทีเรียหลายไอโซเลทที่สร้างได้เฉพาะไอโซเมอร์ *trans*-9, *trans*-11-18:2 เช่น BA17, N25-2, N38, P32-1, P32-2 และ P32-3 เป็นต้น จากผลการทดลองนี้จึงกล่าวได้ว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกต่างสายพันธุ์จะมีความสามารถในการสร้าง CLA ทั้งปริมาณ และชนิดแตกต่างกัน พร้อมกันนั้นองค์ประกอบของอาหารมีผลอย่างยิ่งต่อปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ทดสอบ คือการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ซึ่งเป็นอาหารที่มีสารอาหารครบถ้วนสมบูรณ์ เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกทำให้มีการเจริญของเซลล์ในปริมาณมาก แต่ไม่ได้ส่งผลให้มีการสร้าง CLA มากขึ้น แตกต่างจากการเลี้ยงในอาหารเหลวทดสอบ Modified MRS ที่ถูกลดปริมาณแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน โดยจะไม่มีน้ำตาล และสารสกัดจากเนื้อวัว (Beef extract) เป็นองค์ประกอบ ทำให้เชื้อมีการเจริญน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว MRS แต่กลับมีการสร้าง CLA ได้มากขึ้น ดังนั้นในกรณีนี้ปริมาณการเจริญของเชื้อไม่มีผลต่อปริมาณการสร้าง CLA แต่การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีสารอาหารอย่างจำกัด ร่วมกับความเป็นพิษต่อเซลล์ของกรดไขมันลิโนเลอิก อาจเป็นปัจจัยสำคัญในการกระตุ้นให้เชื้อเกิดการสร้างเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรสมากขึ้น เพื่อลดความเป็นพิษให้เซลล์สามารถอยู่รอดได้ จึงเป็นผลให้มีการสร้าง CLA ได้มากขึ้น ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถสร้าง CLA ได้สูงทั้งจากน้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลืองเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว Modified MRS ได้แก่ สายพันธุ์ *Lactococcus lactis* TISTR1401 และ *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338 ไอโซเลท N25-7 และ N25-19 แต่เนื่องจากในงานวิจัยนี้สนใจ และต้องการแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้าง CLA ไอโซเมอร์ที่มีคุณสมบัติชีววิทยาที่เป็นประโยชน์สูงได้แก่ไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trnas*-10, *cis*-12-18:2 และสร้างไอโซเมอร์ *trans*-9, *trans*-11-18:2 ปริมาณต่ำ ซึ่ง *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338 นั้นสร้างไอโซเมอร์ *trans*-9, *trans*-11-18:2 ปริมาณสูง ดังนั้นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้าง CLA และคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง CLA คือ *Lactococcus lactis* TISTR1401, N25-7 และ N25-19 โดยใช้อาหารเหลว Modified MRS เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบ



รูปที่ 4.1 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบการสร้าง CLA เจริญบนอาหารแข็ง MRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.1 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบการสร้าง CLA เจริญบนอาหารแข็ง MRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.1 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบการสร้าง CLA เจริญบนอาหารแข็ง MRS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.1 สัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบการสร้าง CLA เจริญบนอาหารแข็ง MRS อายุ 24 ชั่วโมง

Isolate code	Cell morphology[a]		
	Shape	Size (μm)[b]	Arrangement
BA17	Rod	0.37-0.41x0.90-1.03	Single
N25-2	Rod	0.32-0.37x0.58-0.63	In pairs
N25-3	Rod	0.37-0.41x0.82-0.91	In pairs
N25-5	Ovoid	0.32-0.41x0.38-0.52	In pairs
N25-7	Coccus or Ovoid	0.26-0.32x0.33-0.39	In pairs or short chains
N25-9	Rod	0.39-0.54x1.20-1.32	Single
N25-19	Coccus or Ovoid	0.39-0.41x0.45-0.54	In pairs
N25-20	Rod	0.32x0.57-0.65	In pairs
N25-21	Ovoid	0.32x0.35-0.45	In pairs
N38	Rod	0.57-0.63x1.30-1.53	Single
P32-1	Rod	0.32-0.45x0.86-1.29	In pairs
P32-2	Rod	0.40-0.50x1.14-1.30	Single
P32-3	Rod	0.41-0.53x1.09-1.46	Single
P47	Rod	0.40-0.51x1.28-1.44	Single
T5	Coccus	0.70-0.80	In pairs
T11	Coccus or Ovoid	0.45-0.52x0.52-0.58	In pairs
T15	Ovoid	0.29-0.33x0.37-0.46	In pairs
TISTR1338	Rod	0.32-0.41x1.65-1.80	Single or in pairs
TISTR1401	Coccus or Ovoid	0.40-0.45	In pairs

หมายเหตุ [a] ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

[b] ตรวจสอบด้วยโปรแกรม Image-Pro Plus Version 6.0.0.260: 1993-2006 (Media Cybernetics, Inc., Japan)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Isolate code	Bacterial count (logCFU/ml)		pH 48 h	CLA isomers content (µg/mg oil)			Total CLA (µg/mg oil)	Conversion (%)
	0 h	48 h		*c*9,*t*11	*t*10,*c*12	*t*9,*t*11		
BA17	7.38	9.54	4.70	-	-	-	-	-
N25-2	7.59	9.28	4.46	1.37	1.94	3.23	6.54	0.65
N25-3	8.18	10.04	4.11	-	-	-	-	-
N25-5	8.04	9.34	4.58	-	-	-	-	-
N25-7	7.00	9.89	4.59	-	-	-	-	-
N25-9	6.58	9.32	4.68	-	5.77	-	5.77	0.58
N25-19	7.59	9.85	4.44	-	-	-	-	-
N25-20	7.41	9.48	4.45	-	-	-	-	-
N25-21	7.64	9.15	4.57	-	-	1.62	1.62	0.16
N38	7.51	7.00	4.66	-	-	-	-	-
P32-1	7.04	7.00	4.63	-	8.24	3.23	11.47	1.15
P32-2	6.81	7.00	4.62	-	-	2.46	2.46	0.25
P32-3	7.23	8.26	4.63	-	-	-	-	-
P47	4.00	8.62	4.61	-	3.15	2.59	5.74	0.57
T5	7.15	8.97	4.36	-	-	-	-	-
T11	7.20	8.91	4.70	-	-	-	-	-
T15	7.46	8.99	4.42	-	-	6.90	6.90	0.69
TISTR1338	8.30	10.04	4.11	-	-	-	-	-
TISTR1401	6.98	9.92	4.16	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบการสร้าง CLA

ตารางที่ 4.3 ปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Isolate code	Bacterial count (logCFU/ml)		pH 48 h	CLA isomers content (µg/mg oil)			Total CLA (µg/mg oil)	Conversion (%)
	0 h	48 h		*c*9,*t*11	*t*10,*c*12	*t*9,*t*11		
BA17	7.40	9.15	4.68	-	3.69	-	3.69	0.37
N25-2	7.36	9.62	4.46	-	-	0.56	0.56	0.06
N25-3	7.45	9.70	4.12	-	-	-	-	-
N25-5	7.20	9.00	4.58	-	-	-	-	-
N25-7	7.08	10.04	4.59	-	-	-	-	-
N25-9	5.00	8.36	4.68	-	-	-	-	-
N25-19	7.75	9.70	4.44	-	-	-	-	-
N25-20	7.04	9.43	4.46	-	0.78	0.50	1.28	0.13
N25-21	7.32	9.18	4.60	-	-	-	-	-
N38	7.62	8.11	4.67	-	-	1.26	1.26	0.13
P32-1	6.90	7.60	4.64	-	-	-	-	-
P32-2	6.93	7.95	4.64	-	0.70	1.02	1.71	0.17
P32-3	7.23	8.36	4.63	-	-	-	-	-
P47	5.41	7.65	4.62	-	1.04	0.62	1.66	0.17
T5	7.04	8.90	4.36	-	-	8.28	8.28	0.83
T11	7.08	10.95	4.63	-	0.34	-	0.34	0.03
T15	7.70	9.15	4.43	-	-	-	-	-
TISTR1338	8.28	10.18	4.12	-	-	-	-	-
TISTR1401	6.79	9.90	4.16	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบการสร้าง CLA

ตารางที่ 4.4 ปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบในอาหารเหลว Modified MRS ที่มีน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Isolate code	Bacterial count (logCFU/ml)		pH 48 h	CLA isomers content (µg/mg oil)			Total CLA (µg/mg oil)	Conversion (%)
	0 h	48 h		*c*9,*t*11	*t*10,*c*12	*t*9,*t*11		
BA17	7.15	7.23	6.77	-	-	15.04	15.04	1.50
N25-2	7.48	8.15	6.60	-	-	0.78	0.78	0.08
N25-3	7.00	7.63	6.81	0.88	0.69	2.09	3.66	0.37
N25-5	7.54	7.98	6.62	4.12	4.66	10.49	19.27	1.93
N25-7	7.36	8.04	6.77	8.32	8.83	25.06	42.22	4.22
N25-9	4.00	5.00	6.81	-	-	4.92	4.92	0.49
N25-19	7.64	8.69	6.65	9.57	8.87	22.30	40.74	4.07
N25-20	7.65	8.32	6.64	3.65	4.79	9.87	18.31	1.83
N25-21	7.56	8.26	6.57	4.75	7.12	14.93	26.79	2.68
N38	7.53	6.82	6.59	-	-	9.46	9.46	0.95
P32-1	6.75	6.49	6.75	-	-	12.17	12.17	1.22
P32-2	7.18	6.92	6.72	-	-	15.79	15.79	1.58
P32-3	7.30	6.83	6.71	-	-	16.07	16.07	1.61
P47	5.58	5.65	6.82	-	-	7.82	7.82	0.78
T5	7.20	8.72	6.56	-	-	9.95	9.95	1.00
T11	7.04	8.20	6.49	1.70	2.39	5.74	9.83	0.98
T15	7.48	8.72	6.91	2.00	2.06	3.85	7.91	0.79
TISTR1338	5.54	9.49	6.73	5.28	7.80	28.00	41.08	4.11
TISTR1401	7.15	8.23	6.75	16.85	16.47	33.75	67.07	6.71

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบการสร้าง CLA

ตารางที่ 4.5 ปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบในอาหารเหลว Modified MRS ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Isolate code	Bacterial count (logCFU/ml)		pH 48 h	CLA isomers content (µg/mg oil)			Total CLA (µg/mg oil)	Conversion (%)
	0 h	48 h		*c*9,*t*11	*t*10,*c*12	*t*9,*t*11		
BA17	7.49	7.70	6.79	-	-	4.81	4.81	0.48
N25-2	6.50	8.08	6.66	-	-	8.42	8.42	0.84
N25-3	6.78	7.86	6.78	-	-	0.80	0.80	0.08
N25-5	6.89	8.00	6.61	5.26	5.94	11.77	22.97	2.30
N25-7	7.40	8.34	6.81	9.53	10.16	23.47	43.16	4.32
N25-9	6.59	6.04	6.72	-	-	4.48	4.48	0.45
N25-19	7.79	8.74	6.64	10.72	7.28	24.64	42.63	4.26
N25-20	7.95	8.61	6.65	2.27	2.30	9.73	14.30	1.43
N25-21	7.58	8.73	6.66	2.51	-	6.77	9.28	0.93
N38	7.56	6.97	6.60	-	-	8.28	8.28	0.83
P32-1	7.08	6.54	6.74	1.39	3.23	10.43	15.05	1.51
P32-2	6.80	6.75	6.71	-	-	8.68	8.68	0.87
P32-3	7.15	7.18	6.75	-	-	15.80	15.80	1.58
P47	5.60	5.81	6.84	-	-	9.98	9.98	1.0
T5	7.08	8.41	6.53	-	8.99	4.16	13.15	1.32
T11	7.11	7.65	6.53	-	-	1.44	1.44	0.14
T15	7.51	8.30	6.93	-	-	-	-	-
TISTR1338	5.81	9.30	6.71	6.53	-	28.64	35.17	3.52
TISTR1401	7.18	8.15	6.76	14.35	17.91	33.15	65.41	6.54

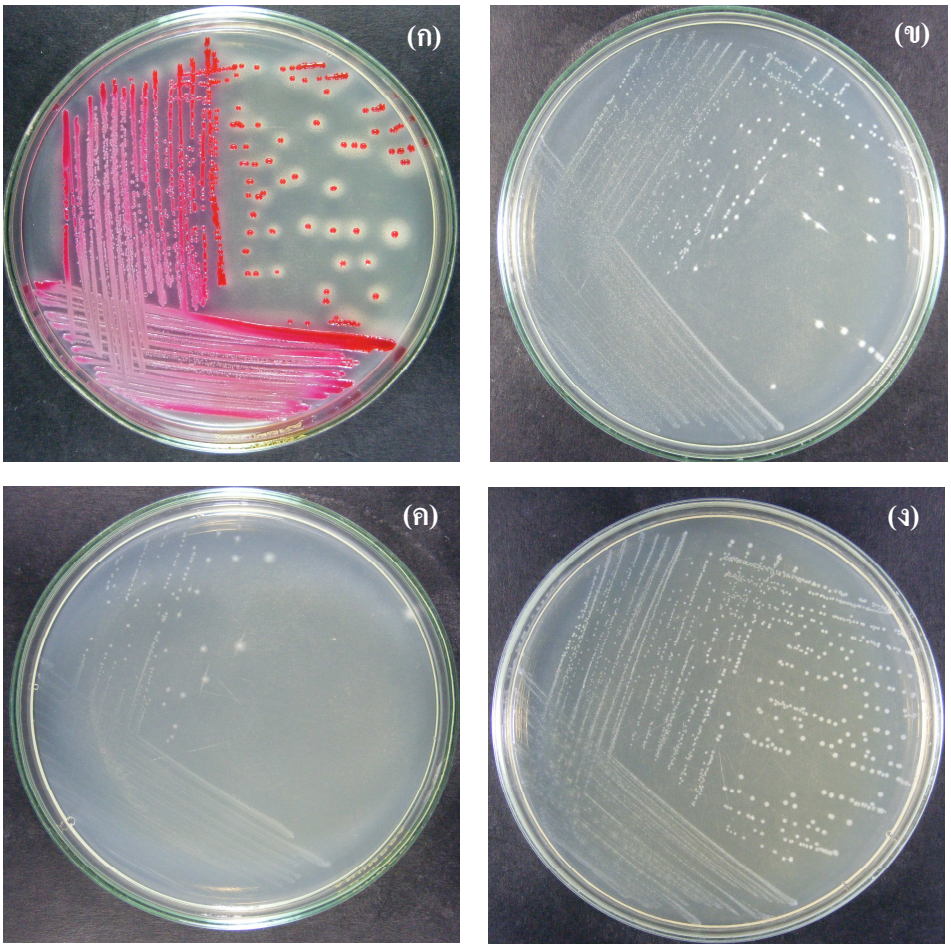
หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบการสร้าง CLA

4.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียกรดแล็กติก

ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียกรดแล็กติก เพื่อตรวจสอบถึงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการสร้าง CLA จากน้ำมันกับความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากมีรายงานระบุว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกจะไม่สามารถสร้าง CLA ได้จากกรดไขมันลิโนเลอิกในรูปเอสเทอร์หรือไทรกลีเซอร์ไรด์ได้ (Ogawa et al., 2001) แต่จากผลการทดลองในข้อ 4.1 พบว่ามีแบคทีเรียกรดแล็กติกหลายสายพันธุ์สามารถสร้าง CLA ได้ทั้งจากน้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งมีกรดไขมันลิโนเลอิกอยู่ในรูปเอสเทอร์กับกลีเซอรอล เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว Modified MRS จึงมีความเป็นไปได้ที่แบคทีเรียกรดแล็กติกจะสร้างเอนไซม์ไลเปสขึ้นมาเพื่อย่อยไขมันให้เป็นกรดไขมันอิสระ และนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะทำให้ได้กรดไขมันลิโนเลอิกอิสระมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการสร้าง CLA ได้สูง ดังนั้นจึงทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียกรดแล็กติก ด้วยอาหารแข็งสำหรับทดสอบการสร้างไลเปส (Lipase test agar or Tween 80 agar) (Atlas, 2004) องค์ประกอบของอาหาร คือ เพปโทน, โซเดียมคลอไรด์, แคลเซียมคลอไรด์ และทวีน 80 ซึ่งคาดว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกจะไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารอาหารไม่สมบูรณ์ จึงทดลองปรับสูตรอาหารโดยคงองค์ประกอบหลักที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบ และเพิ่มสารอาหารอื่น ๆ ซึ่งอ้างอิงจาก Kim et al. (2007) และ El-Sawah, Sherief, and Bayoumy (1995) เพื่อให้แบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถเจริญได้โดยที่ไม่มีน้ำตาล และให้แบคทีเรียเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มาจากทวีน 80 เท่านั้น เปรียบเทียบลักษณะผลบวกกับแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้เป็นปกติ คือ *Serratia marcescens* ดังรูปที่ 4.2ก คือ มีตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนี (Halo formation) ที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร เนื่องจากกรดไขมันอิสระที่ได้จากไขมัน คือ ทวีน 80 ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรีย จับรวมตัวกับเกลือแคลเซียมเกิดการตกตะกอนอยู่รอบ ๆ โคโลนี

จากการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกบนอาหารทดสอบพบว่าจะต้องเลี้ยงเป็นเวลาถึง 15 วัน จึงจะพบตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนี ดังรูปที่ 4.2ข, ค และ ง ซึ่งมีปริมาณตะกอนขุ่นขาวค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับ *Serratia marcescens* เนื่องจากธรรมชาติของแบคทีเรียกรดแล็กติกจะมีการสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ เช่น *Pseudomonas*, *Bacillus* และ *Achromobacter* เป็นต้น (Medina, Katz, González, and Oliver, 2004) จากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ทดสอบทั้งหมดพบเพียง 10 ไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ (ตารางที่ 4.6) ซึ่งการใช้อาหาร Lipase test agar เพียงอาหารเดียวก็สามารถทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียกรดแล็กติกได้ไม่จำเป็นต้องเพิ่มสารอาหารอื่น ๆ และเมื่อเชื่อมโยงถึงความสามารถในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีศักยภาพ ได้แก่ TISTR1401, N25-7 และ N25-19 พบว่าแบคทีเรีย TISTR1401 ไม่สร้างเอนไซม์ไลเปส แต่สามารถสร้าง CLA ได้สูงที่สุด แต่แบคทีเรีย

N25-7 และ N25-19 ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสได้นั้นกลับสร้าง CLA ได้ปริมาณน้อยกว่า ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียกรดแล็กติกไม่เกี่ยวข้องกับปริมาณการสร้าง CLA เนื่องจากมีความเป็นไปได้ว่าในช่วงเวลาการทดสอบการสร้าง CLA ที่บ่มเพียง 48 ชั่วโมงนั้น แบคทีเรียที่ทดสอบยังไม่มีการสร้างเอนไซม์ไลเปส ดังนั้นการสร้าง CLA จากน้ำมันพืชจึงน่าจะขึ้นอยู่กับความสามารถของแบคทีเรียกรดแล็กติกเอง



รูปที่ 4.2 ลักษณะการตกตะกอนของเกลือกรดไขมันรอบโคโลนีของแบคทีเรีย *Serratia marcescens* ที่เป็นผลบวก (ก) และแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7 ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง Lipase test (ข), อาหารแข็ง Modified lipase test 1 (ค) และอาหารแข็ง Modified lipase test 2 (ง) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 15 วัน

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาทดสอบบนอาหารแข็งสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปส และอาหารสูตรดัดแปลง

Isolate code	Lipase test medium	Modified lipase test medium 1	Modified lipase test medium 2
BA17	-	-	0
N25-2	++	+	++
N25-3	+	0	0
N25-5	++	++	++
N25-7	++	+	++
N25-9	-	-	-
N25-19	+	0	+
N25-20	++	0	+
N25-21	++	++	+
N38	0	0	0
P32-1	-	-	-
P32-2	-	-	-
P32-3	-	-	-
P47	-	-	-
T5	+	+	+
T11	+	-	0
T15	++	++	++
TISTR1338	0	0	0
TISTR1401	0	-	0

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีโคโลนีเจริญบนผิวหน้าอาหาร

0 หมายถึง เจริญบนผิวหน้าอาหารแต่ไม่มีตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนี

+ หมายถึง เจริญบนผิวหน้าอาหารและมีตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนีเล็กน้อย

++ หมายถึง เจริญบนผิวหน้าอาหารและมีตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนีเด่นชัด

4.3 การตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือก

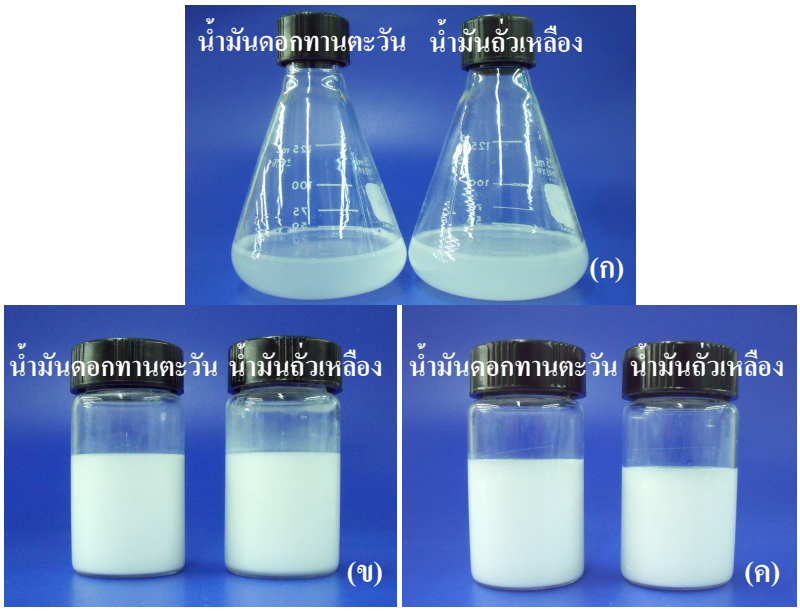
ตรวจสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือก คือ TISTR1401, N25-7 และ N25-19 ในอาหารเหลว Modified MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (Inoculum size) ร้อยละ 1 บ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยตรวจสอบขนาดหยดน้ำมัน, ความเข้มข้นของน้ำมัน, ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น, อุณหภูมิบ่ม และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA

4.3.1 การศึกษาขนาดหยดน้ำมันในระบบอิมัลชันที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA

อิมัลชันที่ใช้ในการทดสอบการสร้าง CLA เป็นอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ (O/W) โดยมีน้ำเป็นวัฏภาคภายนอกหรือเฟสต่อเนื่อง (External or continuous phase) และน้ำมันเป็นวัฏภาคภายในหรือเฟสกระจาย (Internal or dispersed phase) ซึ่งระบบอิมัลชันนี้จะละลายได้ดีในน้ำ จากการทดลองเตรียมอิมัลชันให้มีหยดน้ำมันขนาดเล็กกว่า 1 ไมโครเมตรโดยใช้ทวีน 80 (Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate) เป็นสารก่ออิมัลชัน (Emulsifier agent) นั้นไม่สามารถทำได้ เนื่องจากจะเกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำกับน้ำมันอย่างรวดเร็วทำให้ไม่สามารถลดขนาดหยดน้ำมันได้ การลดขนาดหยดน้ำมันให้มีขนาดเล็กลงจะต้องใช้สารก่ออิมัลชันในปริมาณสูง เพื่อเพิ่มความแข็งแรงกับฟิล์มที่ล้อมรอบเม็ดไขมัน ป้องกันการกลับมารวมตัวกันของเม็ดไขมัน จึงได้ทดลองเตรียมอิมัลชันตามวิธีของ Liu et al. (2006) โดยการใช้สารก่ออิมัลชันผสมระหว่างทวีน 80 และสแปน 80 (Sorbitan monooleate) ซึ่งเป็นสารก่ออิมัลชันประเภทไม่มีประจุ นิยมใช้ในอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ ซึ่งช่วยให้อิมัลชันมีความคงตัวสูง และเตรียมด้วยวิธี Emulsion inversion point (EIP) โดยมีหลักการคือ การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของน้ำหรือน้ำมันในระบบจะทำให้เกิดการกลับวัฏภาค ทำให้ได้วัฏภาคภายในที่มีขนาดเล็ก ซึ่งจากการทดลองเตรียมอิมัลชันด้วยวิธีดังกล่าว พบว่า การเตรียมอิมัลชันที่น้ำมันดอกทานตะวัน หรือน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก เป็นวัฏภาคภายในให้มีความคงตัวจะต้องใช้สารก่ออิมัลชันผสมให้มีค่าสัดส่วนการชอบน้ำต่อน้ำมัน (Hydrophilic lipophilic balance, HLB) เท่ากับ 10.3 โดยเกิดจากการผสมระหว่างทวีน 80 และ สแปน 80 ซึ่งมีค่า HLB 15.0 และ 4.3 ตามลำดับ ปริมาณสารก่ออิมัลชันรวมร้อยละ 9 โดยน้ำหนัก และเตรียมที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จะได้อิมัลชันสีขาวขุ่น มีขนาดหยดน้ำมันเท่ากับ 0.83 ไมโครเมตร จะคงตัวไม่เกิน 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง และเมื่อลดขนาดโดยใช้เครื่องลดขนาดอนุภาคเม็ดไขมันระบบสองระดับความดัน (Homogenizer, 15 MR-8TA, APV Gaulin, INC., U.S.A.) โดยระดับความดันที่ 1 เท่ากับ 500 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และความดันระดับที่ 2 เท่ากับ 5,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จะได้อิมัลชันสีขาวขุ่น และมีขนาดหยดน้ำมันเท่ากับ 0.64 ไมโครเมตร มีความคงตัวไม่น้อยกว่า 1 เดือน อิมัลชันที่ได้จากการเตรียมโดยใช้ทวีน 80 เป็นสารก่ออิมัลชันชนิดเดียว และการใช้สารก่ออิมัลชันผสมมีลักษณะดังรูปที่ 4.3 และมีขนาดหยดน้ำมันดังแสดงในตารางที่ 4.7 รูปที่ 4.4 แสดงการกระจายของขนาดหยดน้ำมันของอิมัลชัน

ที่เตรียมได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอิมัลชันที่เตรียมจากสารก่ออิมัลชันผสม และผ่านการลดขนาดจะมีการกระจายของขนาดหยดน้ำมันในช่วงแคบ ๆ จึงเป็นผลให้อิมัลชันดังกล่าวมีความคงตัว และละลายน้ำได้ดี

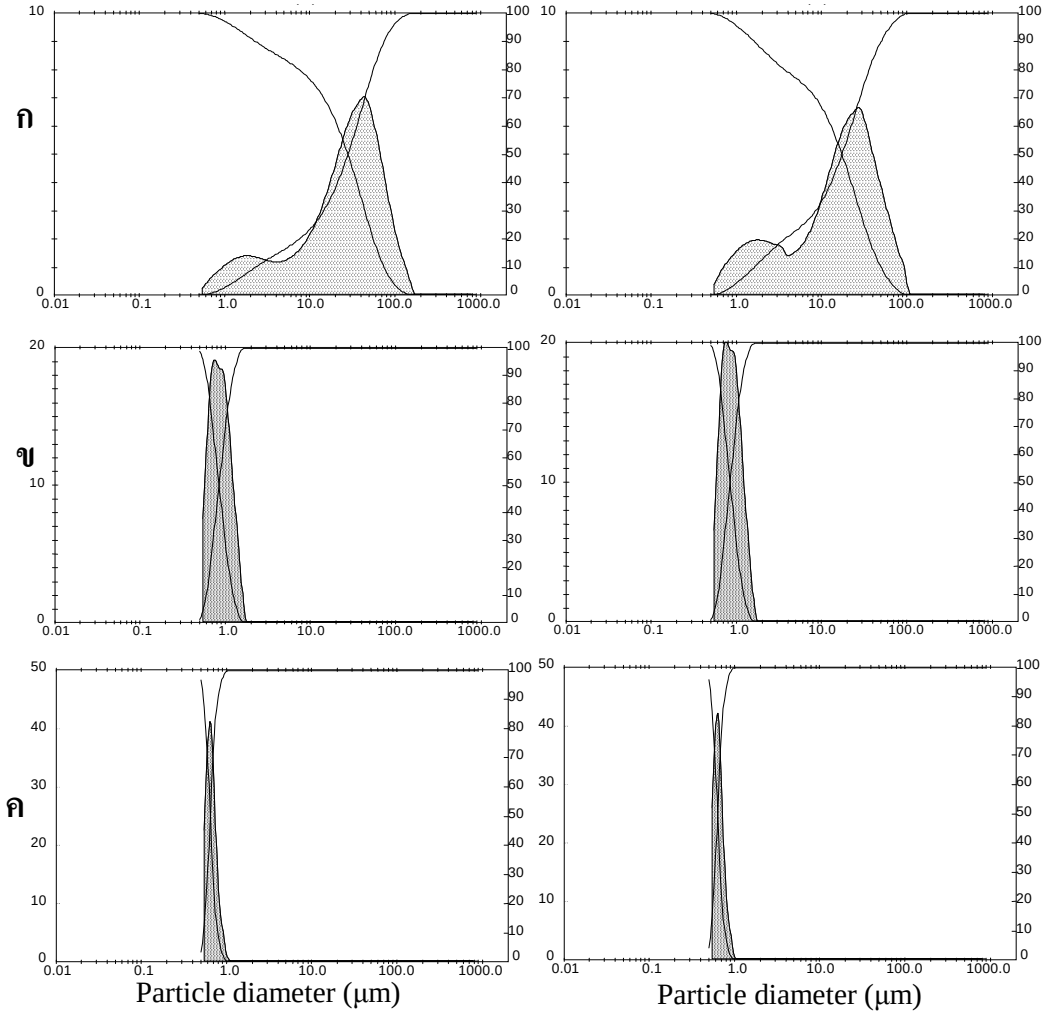
จากนั้นนำอิมัลชันที่มีขนาดหยดน้ำมันต่าง ๆ มาเป็นสารตั้งต้นในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อทดสอบผลของขนาดหยดน้ำมันต่อปริมาณการสร้าง CLA ซึ่งตั้งสมมติฐานว่าขนาดหยดน้ำมันที่เล็กลงจะทำให้น้ำมันละลาย และกระจายได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เกิดการสัมผัสกับเซลล์ที่มีเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรสได้มากขึ้น ช่วยเพิ่มปริมาณการสร้าง CLA เตรียมอิมัลชันให้ปลอดเชื้อโดยอิมัลชันที่มีหยดน้ำมัน 0.83 และ 0.64 ไมโครเมตร จะกรองผ่านตัวกรองที่มีความละเอียด 0.45 และ 0.2 ไมโครเมตร ตามลำดับ ซึ่งขนาดหยดน้ำมันจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังผ่านการกรอง ผลการทดลองพบว่า ขนาดหยดน้ำมันไม่มีผลต่อปริมาณการสร้าง CLA ทางสถิติ แต่มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อขนาดหยดน้ำมันเล็กลงทั้งในน้ำมันดอกทานตะวันและน้ำมันถั่วเหลือง ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และ 4.9 นอกจากนั้นปริมาณสารก่ออิมัลชันที่มากขึ้นไม่ส่งผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นจากผลของการสร้าง CLA ผลของความคงตัวของอิมัลชัน และการละลายน้ำได้ดี จึงเลือกใช้อิมัลชันขนาด 0.64 ไมโครเมตร เป็นสารตั้งต้นสำหรับการทดสอบปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อปริมาณการสร้าง CLA



รูปที่ 4.3 ลักษณะอิมัลชันที่เตรียมได้ (ก) คือ อิมัลชันที่มีขนาดหยดน้ำมันเท่ากับ 9.44 และ 10.13 ไมโครเมตร, (ข) คืออิมัลชันที่มีขนาดหยดน้ำมันเท่ากับ 0.83 ไมโครเมตร และ (ค) คืออิมัลชันที่มีขนาดหยดน้ำมันเท่ากับ 0.64 ไมโครเมตร

ตารางที่ 4.7 ขนาดหยดน้ำมันในระบบอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำที่เตรียมได้

Preparation method	Oil droplet diameter ($d_{3,2}$) (μm)	
	Sunflower oil	Soybean oil
1% (w/v) Tween 80®	10.13	9.44
5.04% (w/v) Tween 80®+3.96% (w/v) Span 80®+Stirrer	0.83	0.83
5.04% (w/v) Tween 80®+3.96% (w/v) Span 80®+5,000 psi	0.64	0.64



รูปที่ 4.4 ลักษณะการกระจายของขนาดหยดน้ำมันของอิมัลชันที่เตรียมได้จากน้ำมันดอกทานตะวัน (ซ้าย) และน้ำมันถั่วเหลือง (ขวา) โดยที่ (ก) คืออิมัลชันที่เตรียมจากทวีน 80, (ข) คืออิมัลชันที่เตรียมจากสารก่ออิมัลชันผสม และ (ค) คืออิมัลชันที่เตรียมจากสารก่ออิมัลชันผสม และผ่านการลดขนาดด้วยเครื่องลดขนาดความดัน 5,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ตารางที่ 4.8 ผลของขนาดหยดน้ำมันดอกทานตะวันต่อปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติก

Isolate code	Oil droplet diameter (µm)	Bacterial count 48 h (logCFU/ml)	pH 48 h	CLA content (µg/mg oil)			Conversion (%)
				CLA1*	CLA2**	Total CLA	
N25-7	10.13	7.69	6.76±0.01	12.50±3.19[a]	34.91±2.07[a]	47.41±1.11[a]	4.74
	0.83	8.46	6.63±0.00	12.07±2.21[a]	39.80±1.87[a]	51.87±0.35[a]	5.19
	0.64	8.51	6.63±0.01	17.00±3.49[a]	45.05±17.06[a]	62.05±20.55[a]	6.21
N25-19	10.13	8.23	6.77±0.01	15.34±3.93[a]	29.59±3.75[a]	44.93±7.67[a]	4.49
	0.83	8.15	6.69±0.01	12.46±0.27[a]	29.77±2.85[a]	42.23±3.11[a]	4.22
	0.64	8.18	6.68±0.01	20.16±1.55[a]	41.65±0.31[b]	61.81±1.86[b]	6.18
TISTR1401	10.13	8.18	6.82±0.02	43.51±2.38[a]	36.77±2.57[a]	80.28±4.96[a]	8.03
	0.83	8.45	6.84±0.00	41.81±0.15[a]	40.22±7.67[a]	82.03±7.51[a]	8.20
	0.64	8.32	6.85±0.02	40.21±6.45[a]	36.68±7.23[a]	76.88±13.67[a]	7.69

หมายเหตุ CLA1* = *cis*-9,*trans*-11-18:2 + *trans*-10, *cis*-12-18:2

CLA2** = *trans*-9,*trans*-11-18:2

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งของแต่ละไอโซเลทแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.9 ผลของขนาดหยดน้ำมันถั่วเหลืองต่อปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติก

Isolate code	Oil droplet diameter (µm)	Bacterial count 48 h (logCFU/ml)	pH 48 h	CLA content (µg/mg oil)			Conversion (%)
				CLA1*	CLA2**	Total CLA	
N25-7	9.44	8.18	6.75±0.02	20.94±4.80 [a]	27.58±0.10 [a]	48.52±4.90 [a]	4.85
	0.83	8.15	6.78±0.02	13.17±5.29 [a]	25.62±4.69 [a]	38.79±9.98 [a]	3.88
	0.64	7.72	6.76±0.01	11.92±2.72 [a]	31.72±5.58 [a]	43.64±8.30 [a]	4.36
N25-19	9.44	8.20	6.79±0.02	12.48±1.24 [a]	36.00±8.38 [a]	48.48±9.62 [a]	4.85
	0.83	8.15	6.81±0.07	21.29±2.76 [b]	39.83±1.64 [a]	61.13±2.64 [a]	6.11
	0.64	8.15	6.78±0.01	20.56±1.64 [b]	33.94±1.98 [a]	54.50±0.34 [a]	5.45
TISTR1401	9.44	7.15	6.83±0.04	22.77±0.71 [ab]	24.73±0.63 [b]	47.50±1.34 [ab]	4.75
	0.83	7.67	6.79±0.02	26.74±2.94 [b]	25.44±0.83 [b]	52.18±3.76 [b]	5.22
	0.64	7.62	6.84±0.01	20.84±1.00 [a]	21.00±0.15 [a]	41.83±1.15 [a]	4.18

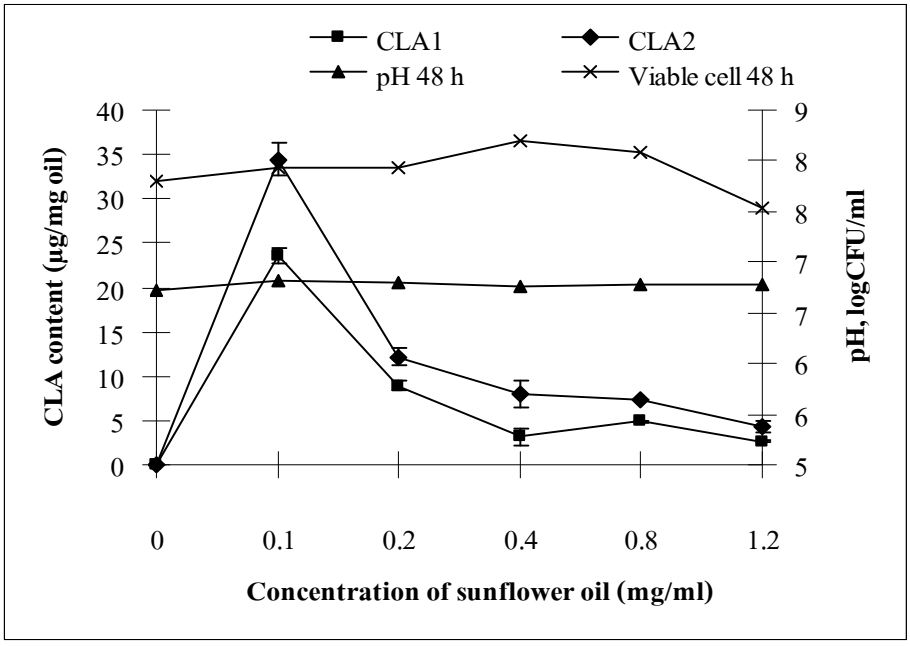
หมายเหตุ CLA1* = *cis*-9,*trans*-11-18:2 + *trans*-10, *cis*-12-18:2

CLA2** = *trans*-9,*trans*-11-18:2

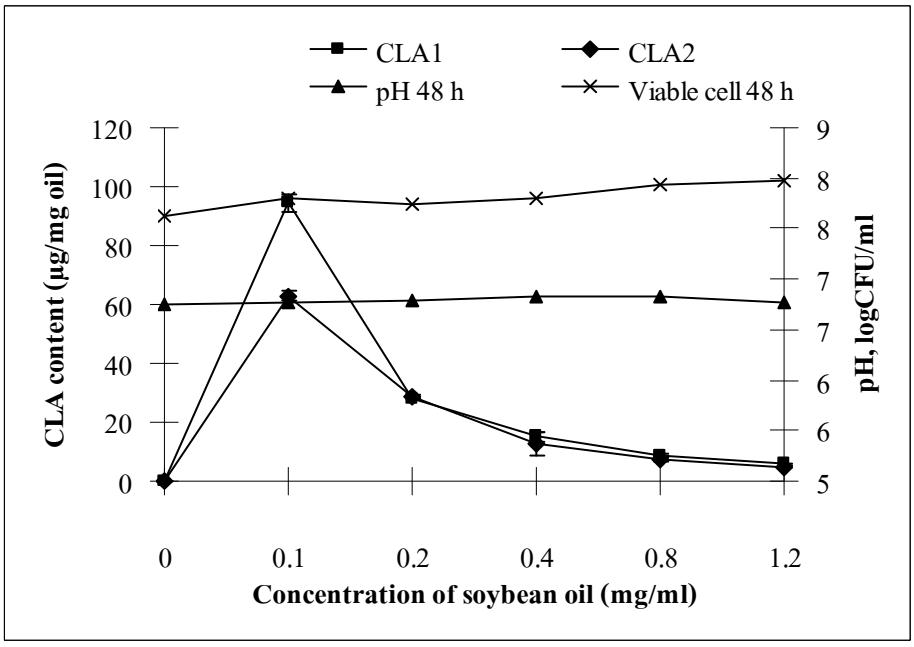
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งของแต่ละไอโซเลทแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

4.3.2 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA

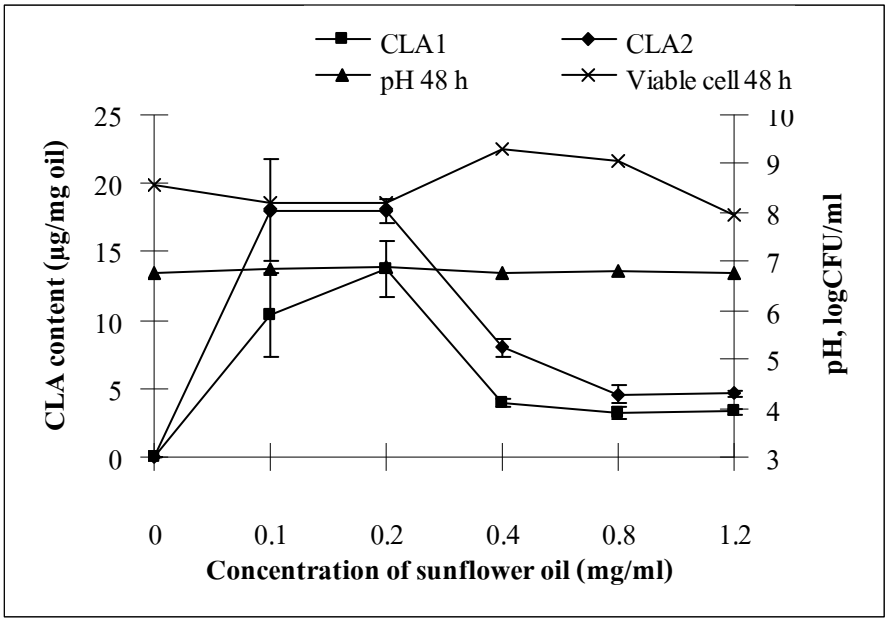
จากการทดสอบความเข้มข้นของน้ำมันที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA ของแบคทีเรียที่คัดเลือก พบว่า สามารถสร้าง CLA ได้สูงที่สุดเมื่อมีน้ำมันดอกทานตะวัน หรือน้ำมันถั่วเหลืองเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.5, 4.6, 4.8, 4.9 และ 4.10) ยกเว้นไอโซเลท N25-19 สามารถสร้าง CLA ได้สูงที่สุดเมื่อมีน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.7) ซึ่งปริมาณน้ำมันที่มากขึ้นไม่ได้มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นข้อดีของการใช้น้ำมันเป็นสารตั้งต้นแทนการใช้กรดไขมันอิสระ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำมันที่มากขึ้นไม่ได้เพิ่มปริมาณการสร้าง CLA ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกมีขีดจำกัด ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับความจำเพาะของเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรสที่เฉพาะเจาะจงกับกรดไขมันลิโนเลอิกในรูปอิสระ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim and Liu (2002) ที่ศึกษาการสร้าง CLA จากน้ำมันดอกทานตะวันด้วย *Lactococcus lactis* IO-1 ในน้ำนมไขมันเต็ม ซึ่งจะสร้าง CLA ได้สูงเมื่อใช้น้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 0.1- 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีการสร้าง CLA ลดลงเมื่อมีน้ำมันเข้มข้นสูงขึ้น แต่การศึกษาของ Puniya et al. (2008) และ Puniya et al. (2009) พบว่า *Lactobacillus brevis* 02 ที่แยกได้จากกระเพาะหมักของวัว และแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผลิตภัณฑ์นม คือ *Lactobacillus casei* สามารถสร้าง CLA ได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เตรียมจากหางนม (Skim milk medium) ที่มีน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 2.5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามสามารถผลิต CLA ได้เพียง 10.53 และ 11.0 มิลลิกรัมต่อกรัมไขมันตามลำดับ แต่การใช้กรดไขมันลิโนเลอิกอิสระเป็นสารตั้งต้นในการผลิต CLA นั้น ความเข้มข้นของสารตั้งต้นจะมีผลอย่างยิ่งต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติก เนื่องจากแบคทีเรียจะถูกยับยั้งการเจริญด้วยกรดไขมันลิโนเลอิกที่มากเกินไป เช่น การศึกษาของ Alonso, Cuesta, and Gilliland (2003) ที่พบว่า *Lactobacillus acidophilus* L1 จะผลิต CLA ได้สูงที่สุดเมื่อมีกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มีปริมาณการสร้าง CLA ลดลงเมื่อมีกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้นมากขึ้น เนื่องจากมีปริมาณการเจริญของแบคทีเรียลดลง การยับยั้งการเจริญของกรดไขมันลิโนเลอิกยังพบในการศึกษาแบคทีเรียกลุ่ม propionibacteria (Jiang, Björck, and Fondén, 1998) ซึ่งสร้าง CLA ได้สูงเมื่อมีกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้นจะมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต และการสร้าง CLA ลดลงเช่นเดียวกัน แต่มีแบคทีเรียกรดแล็กติกบางสายพันธุ์ที่สามารถทนกรดไขมันลิโนเลอิกได้สูง เช่น *Lactobacillus acidophilus* ADH และ *Lactobacillus acidophilus* AKU 1137 ที่สร้าง CLA ได้สูงจากกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Xu et al., 2008; Ogawa et al., 2001)



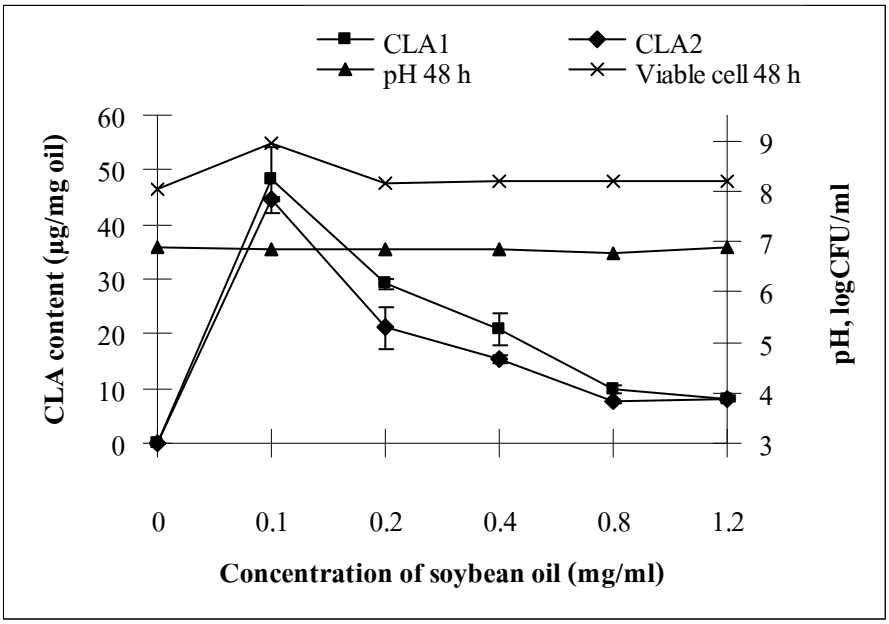
รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันดอกทานตะวันต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7



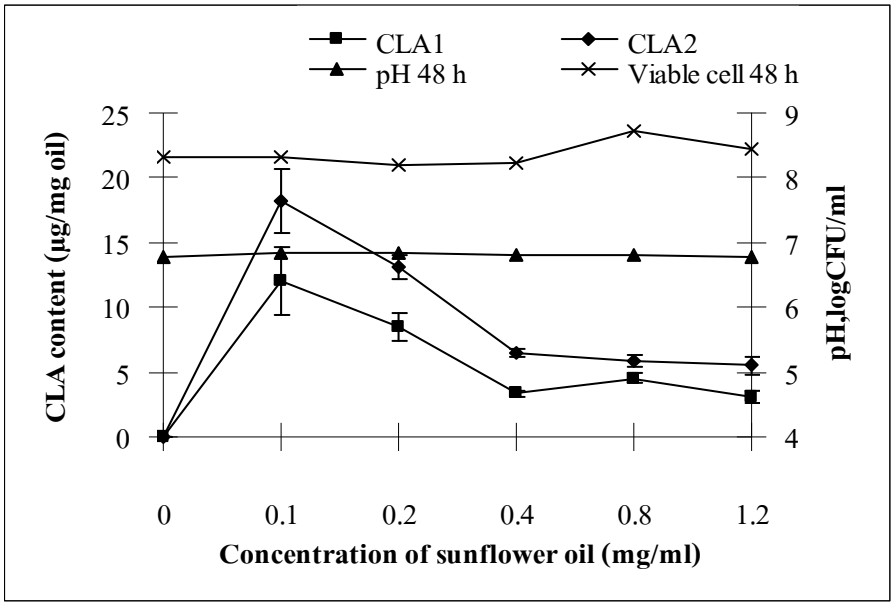
รูปที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7



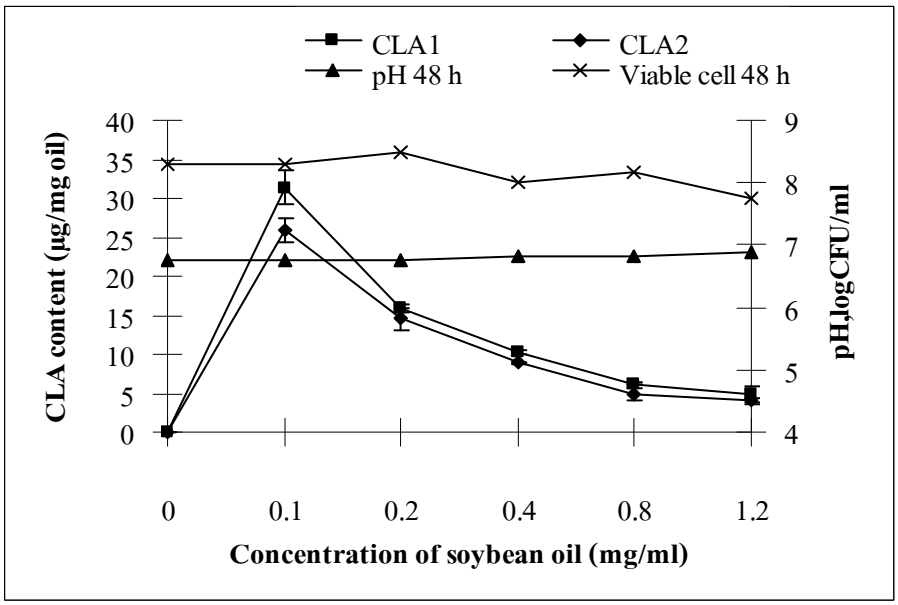
รูปที่ 4.7 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันดอกทานตะวันต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของ แบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-19



รูปที่ 4.8 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-19



รูปที่ 4.9 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันดอกทานตะวันต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401



รูปที่ 4.10 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401

นอกจากข้อมูลของความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA แล้ว ผลการทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำมันต่างชนิดกันมีผลต่อปริมาณการสร้าง CLA1 และ CLA2 คือ การใช้น้ำมันดอกทานตะวันเป็นสารตั้งต้นจะทำให้มีการสร้าง CLA2 มากกว่า CLA1 ส่วนการใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นสารตั้งต้นจะทำให้มีการสร้าง CLA1 มากกว่า CLA2 ซึ่งพบลักษณะการสร้างแบบนี้ทั้งในแบคทีเรีย TISTR1401, N25-7 และ N25-19 ดังนั้นหากต้องการผลิต CLA1 ซึ่งเป็นไอโซเมอร์ที่มีประโยชน์ปริมาณสูงด้วยแบคทีเรียนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาชนิดของน้ำมันที่เหมาะสมเพื่อการผลิต CLA1 ด้วย

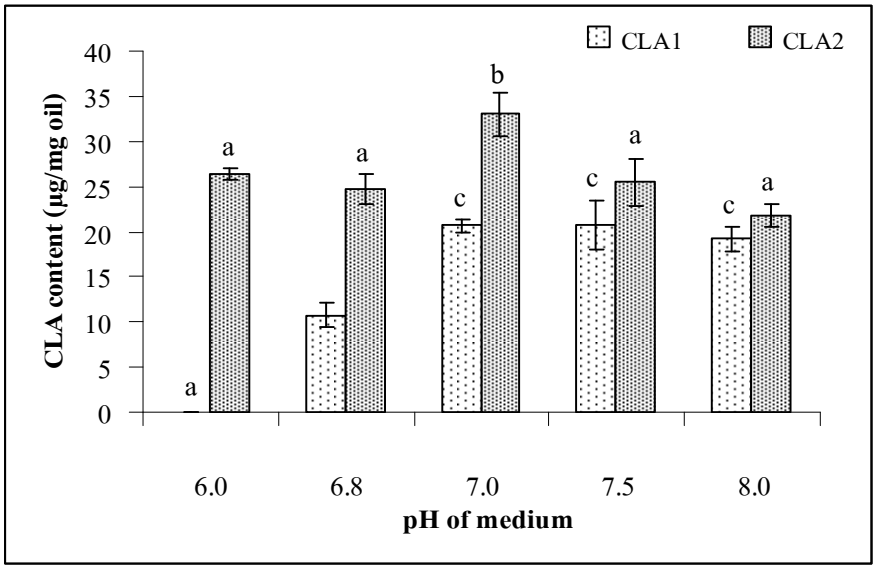
4.3.3 การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA

ทดสอบปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยใช้น้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีขนาดหยดน้ำมัน 0.64 ไมโครเมตร เพียงชนิดเดียวเป็นสารตั้งต้น เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม มีความเป็นไปได้ว่าจะขึ้นอยู่กับกิจกรรมของเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรสเป็นสำคัญ ไม่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมัน ดังนั้นจึงใช้น้ำมันดอกทานตะวันเป็นสารตั้งต้นในการทดสอบ ทำการทดสอบโดยปรับให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0, 6.5, 6.8, 7.0, 7.5 และ 8.0±0.2 พบว่า การสร้าง CLA จะมีปริมาณมากเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็นกลางคือที่ 6.8-7.0 แต่จะมีปริมาณการสร้างจะลดลง เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เป็นด่างเพิ่มมากขึ้น (ตารางที่ 4.10-4.12) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับระบบการทำงานของเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรสที่ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เป็นด่างเล็กน้อยจะส่งผลให้เกิดการสร้าง CLA ไอโซเมอร์ *trans*-9, *trans*-11-18:2 (CLA2) ลดลง แต่ไม่มีผลต่อปริมาณการสร้าง CLA ไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-10, *cis*-12-18:2 (CLA1) ซึ่งลักษณะการสร้างดังกล่าวจะพบได้ทุกแบคทีเรียที่ทดสอบดังแสดงในรูปที่ 4.11-4.13 ดังนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA แต่ละสายพันธุ์ที่พิจารณาจากปริมาณ CLA ทั้งหมด และปริมาณ CLA1 เป็นหลัก คือ 7.0, 7.5 และ 7.0 สำหรับแบคทีเรีย N25-7, N25-19 และ TISTR1401 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองที่ได้แตกต่างจาก Dong and Qi (2006) ที่ศึกษาการสร้าง CLA จากน้ำมันอัลฟาลฟาด้วย *Lactobacillus acidophilus* 1.1854 ในน้ำนมไขมันเต็ม ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ 6.4 ซึ่งเป็นกรดเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียที่ทดสอบนั้นเป็นสายพันธุ์ที่แตกต่าง ความจำเพาะของค่าความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นจึงแตกต่างกัน

ตารางที่ 4.10 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7

Initial of pH medium	Bacterial count 48 h (logCFU/ml)	pH 48 h	Total CLA (µg/mg oil)	Conversion (%)
6.0	7.68	5.99±0.00	26.42±0.68[a]	2.64
6.8	8.04	6.67±0.01	35.50±2.93[b]	3.55
7.0	8.11	6.76±0.01	53.74±3.10[d]	5.37
7.5	8.11	7.13±1.88	46.27±5.37[cd]	4.63
8.0	8.11	7.19±0.01	40.95±0.13[bc]	4.10

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

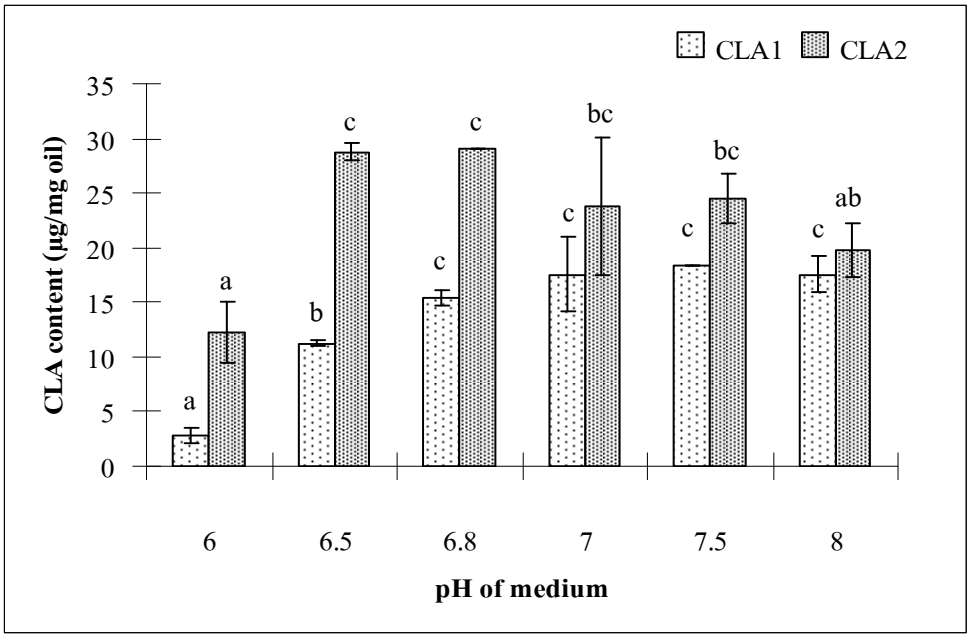


รูปที่ 4.11 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการสร้างไอโซเมอร์ CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7

ตารางที่ 4.11 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-19

Initial of pH medium	Bacterial count 48 h (logCFU/ml)	pH 48 h	Total CLA (µg/mg oil)	Conversion (%)
6.0	7.32	6.02±0.00	15.00±3.56^{a}	1.50
6.5	8.20	6.50±0.01	40.03±0.55^{bc}	4.00
6.8	8.15	6.72±0.01	44.46±0.57^{c}	4.45
7.0	8.11	6.85±0.00	41.31±2.96^{bc}	4.13
7.5	8.15	7.13±0.02	42.91±2.21^{bc}	4.29
8.0	8.18	7.28±0.01	37.32±4.10^{b}	3.73

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

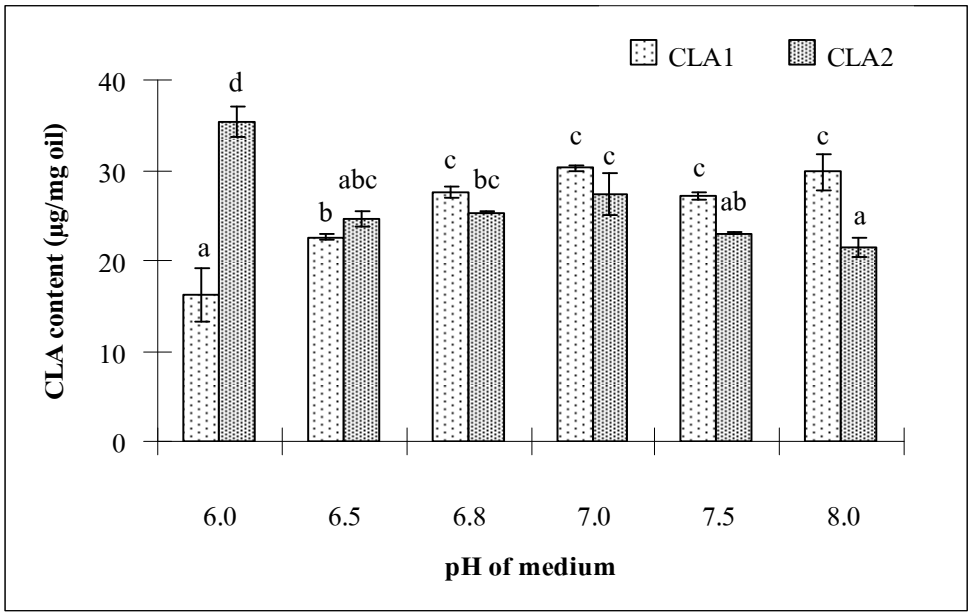


รูปที่ 4.12 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการสร้างไอโซเมอร์ CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-19

ตารางที่ 4.12 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401

Initial of pH medium	Bacterial count 48 h (logCFU/ml)	pH 48 h	Total CLA (µg/mg oil)	Conversion (%)
6.0	8.15	6.05±0.01	51.58±4.66^{ab}	5.16
6.5	8.11	6.45±0.05	47.21±0.59^{a}	4.72
6.8	8.32	6.66±0.01	52.94±0.40^{ab}	5.29
7.0	8.30	6.80±0.01	57.56±2.55^{b}	5.76
7.5	8.28	7.07±0.01	50.24±0.30^{a}	5.02
8.0	8.18	7.24±0.01	51.23±3.05^{ab}	5.12

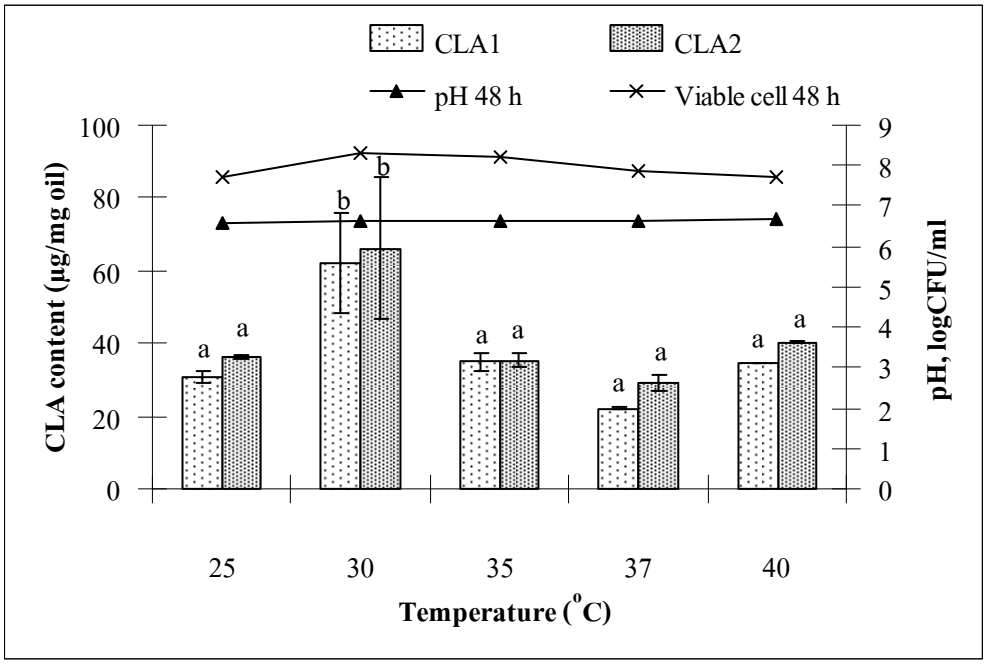
หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)



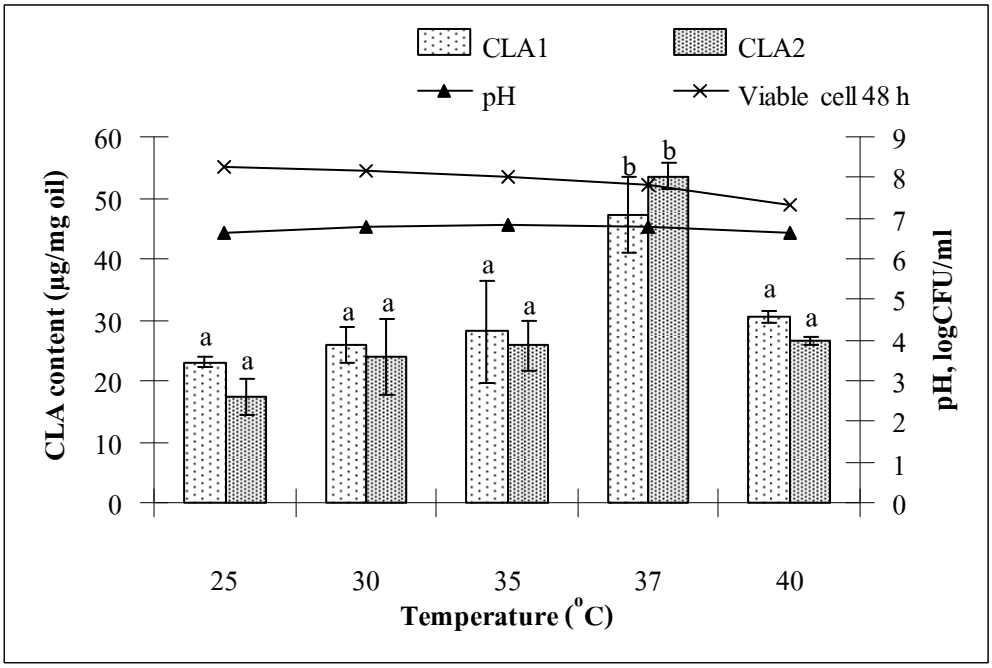
รูปที่ 4.13 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการสร้างไอโซเมอร์ CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401

4.3.4 การศึกษาอุณหภูมิบ่มที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA

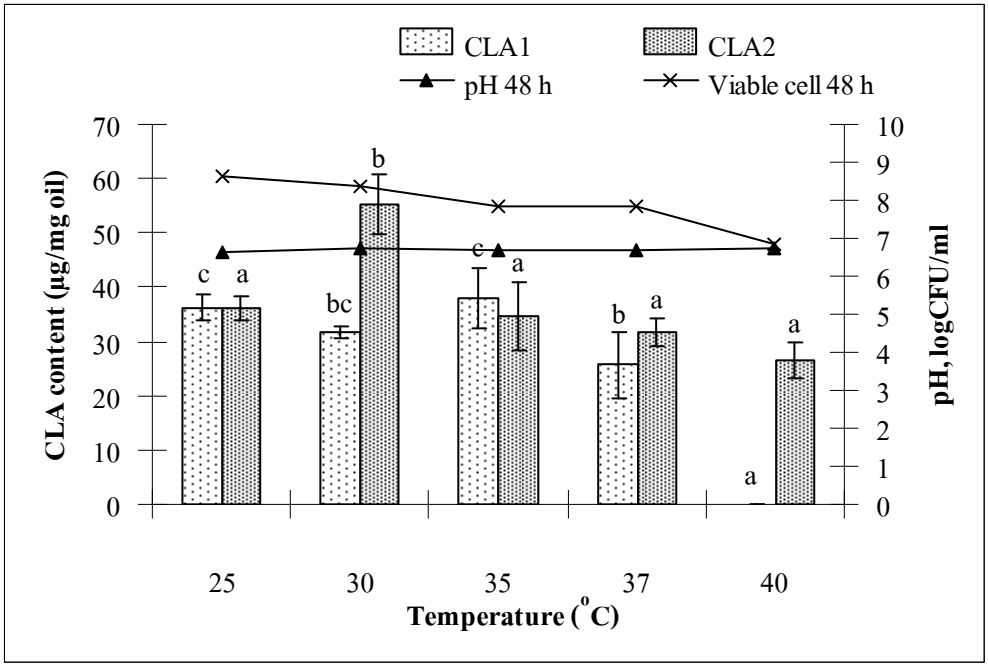
ศึกษาอุณหภูมิบ่มที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA โดยควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 7.0±0.2 และใช้น้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขนาดหยดน้ำมัน 0.64 ไมโครเมตร เป็นสารตั้งต้นเพียงชนิดเดียว เนื่องจากอุณหภูมิบ่มที่เหมาะสมน่าจะจำเพาะกับการทำงานของเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรส ทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดยบ่มในโถที่มีสารดักจับออกซิเจน พบว่า อุณหภูมิบ่มมีผลต่อปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียที่ทดสอบ และอุณหภูมิบ่มที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA นั้นจะจำเพาะกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย โดยที่ไอโซเลท N25-7, N25-19 และสายพันธุ์ TISTR1401 จะสร้าง CLA ได้สูงที่อุณหภูมิบ่ม 30, 37 และ 30 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.14, 4.15 และ 4.16 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามสำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ TISTR1401 การบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะทำให้มีการสร้าง CLA2 (*trans*-9, *trans*-11-18:2) ได้น้อยกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และมีปริมาณ CLA1 มากกว่า ดังนั้นอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้าง CLA สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ TISTR1401



รูปที่ 4.14 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7



รูปที่ 4.15 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-19



รูปที่ 4.16 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401

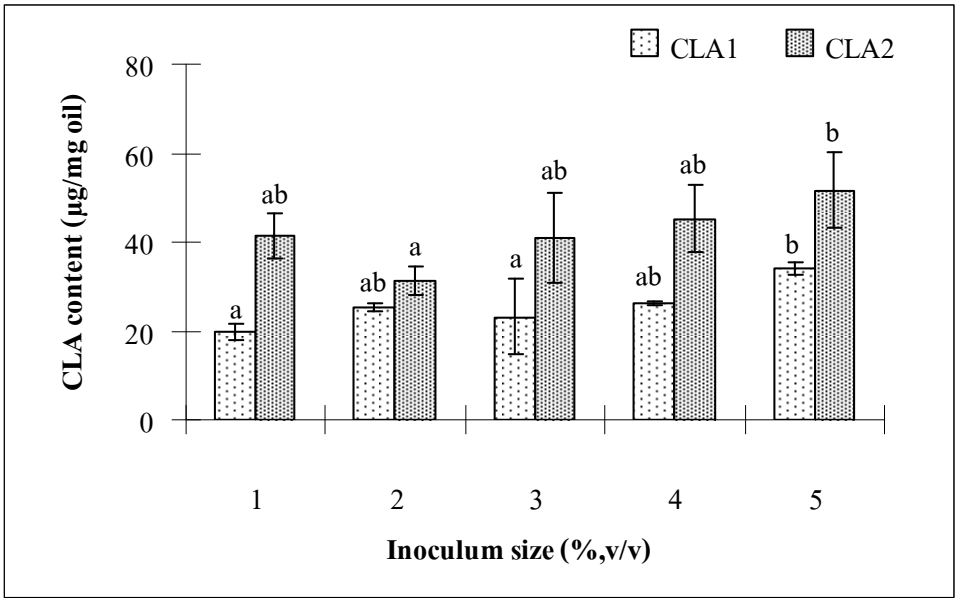
4.3.5 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA

ศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA จะควบคุมปัจจัยการเจริญคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 7.0±0.2 อุณหภูมิบ่ม 35 องศาเซลเซียส และใช้น้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบที่ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 โดยปริมาตร ซึ่งกล้าเชื้อที่ใช้นั้นจะมีเซลล์อยู่ประมาณ 10^6-10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่า การเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นมีแนวโน้มว่าจะเกิดการสร้าง CLA ทั้งหมดมากขึ้นดังแสดงในตารางที่ 4.13-4.15 เมื่อพิจารณาปริมาณ CLA ทั้งหมด ร่วมกับปริมาณ CLA1 และ CLA2 ที่เชื้อผลิตขึ้น จะได้ว่าปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA ของแบคทีเรียไอโซเลท N25-7, N25-19 และสายพันธุ์ TISTR1401 คือปริมาณร้อยละ 2, 4 และ 4 ตามลำดับ (รูปที่ 4.17-4.19) แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้แตกต่างจากการศึกษาการผลิต CLA จากน้ำมันเมล็ดอัลฟาลฟาที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ในน้ำนมไขมันเต็มด้วย *Lactobacillus acidophilus* 1.1854 พบว่า การเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นมากกว่าร้อยละ 2.5 จะพบปริมาณการสร้างลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยได้อธิบายว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่มากพอ จะช่วยลดผลที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญเนื่องจากกรดไขมันลิโนเลอิกได้ แต่การใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นมากเกินพอจะทำให้เกิดภาวะที่มีสารอาหารอย่างจำกัด ทำให้เชื้อมีกิจกรรมลดลงเป็นผลให้มีปริมาณการสร้าง CLA ลดลง (Dong and Qi, 2006)

ตารางที่ 4.13 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7

Inoculum size (%, v/v)	Bacterial count (logCFU/ml)		pH 48 h	Total CLA (µg/mg oil)	Conversion (%)
	0 h	48 h			
1	5.56	7.92	6.76±0.01	61.16±3.30^{ab}	6.12
2	5.83	7.48	6.73±0.01	56.51±4.18^{a}	5.65
3	6.04	7.61	6.71±0.01	64.15±18.61^{ab}	6.42
4	6.18	8.00	6.73±0.01	71.54±8.29^{ab}	7.15
5	6.15	8.04	6.71±0.01	85.60±9.77^{b}	8.56

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

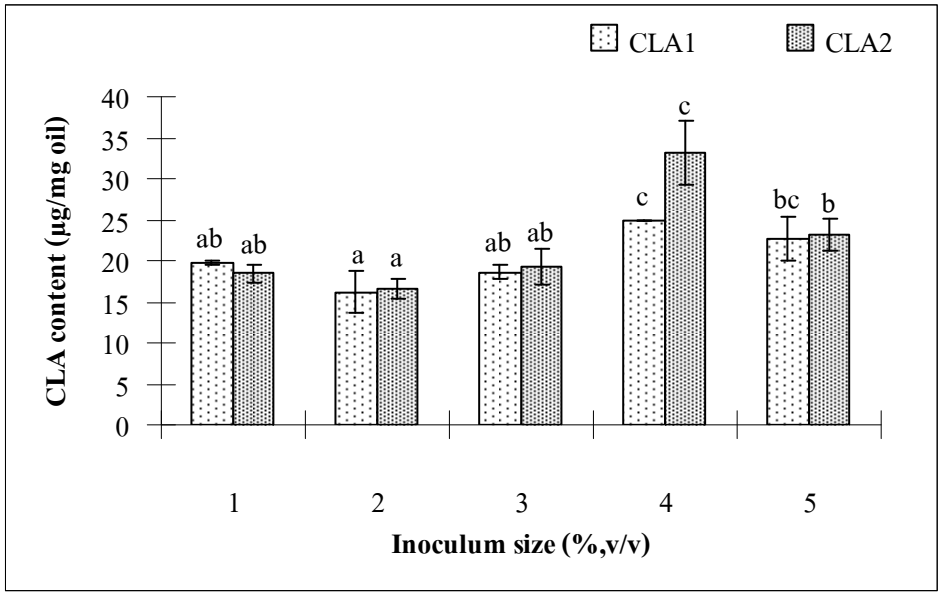


รูปที่ 4.17 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการสร้างไอโซเมอร์ CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-7

ตารางที่ 4.14 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท N25-19

Inoculum size (%, v/v)	Bacterial count (logCFU/ml)		pH 48 h	Total CLA (µg/mg oil)	Conversion (%)
	0 h	48 h			
1	5.86	7.95	6.84±0.03	38.21±1.43[a]	3.82
2	5.88	7.82	6.76±0.01	32.68±3.78[a]	3.27
3	6.11	7.97	6.77±0.02	37.89±1.47[a]	3.79
4	6.30	8.23	6.88±0.01	58.05±4.02[c]	5.81
5	6.40	8.04	6.75±0.01	45.78±0.75[b]	4.58

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

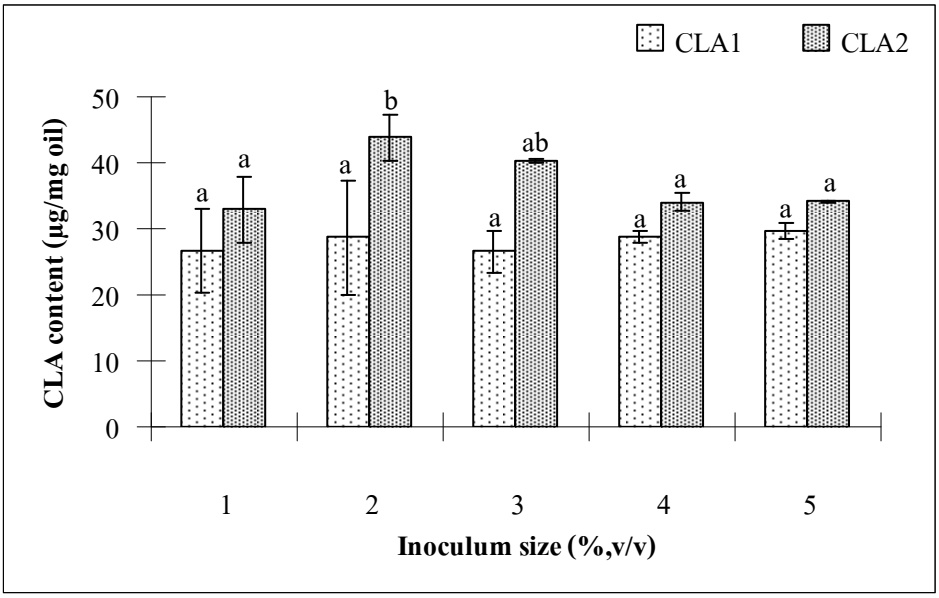


รูปที่ 4.18 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการสร้างไอโซเมอร์ CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติก ไอโซเลท N25-19

ตารางที่ 4.15 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการเจริญ และปริมาณการสร้าง CLA ทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401

Inoculum size (%, v/v)	Bacterial count (logCFU/ml)		pH 48 h	Total CLA (µg/mg oil)	Conversion (%)
	0 h	48 h			
1	5.38	8.18	6.73±0.01	59.70±11.34[a]	5.97
2	5.57	8.28	6.74±0.01	72.55±12.05[a]	7.26
3	5.83	8.32	6.79±0.01	66.90±3.44[a]	6.69
4	6.08	8.15	6.75±0.01	62.90±0.33[a]	6.29
5	6.15	8.08	6.73±0.02	63.85±1.24[a]	6.38

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)



รูปที่ 4.19 ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณการสร้างไอโซเมอร์ CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401

4.4 การทดสอบการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกแบบกล้าเชื้อผสม

ทดสอบการสร้าง CLA โดยใช้กล้าเชื้อผสม เพื่อให้เกิดการแข่งขัน และ/หรือส่งเสริมการสร้าง CLA ระหว่างเชื้อ เปรียบเทียบปริมาณการสร้างกับการใช้เชื้อเดี่ยว ซึ่งจากการทดสอบปัจจัยการเจริญ และความเข้มข้นของน้ำมันต่อการสร้าง CLA พบว่า แบคทีเรียกรดแล็กติกที่ทดสอบจะสร้าง CLA ที่เหมาะสมที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นอยู่ในช่วง 7.0-7.5±0.2 และอุณหภูมิบ่ม 30-37 องศาเซลเซียส มีน้ำมันเข้มข้น 0.1-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงได้ควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง CLA ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบการสร้าง CLA แบบกล้าเชื้อผสม โดยกำหนดให้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Modified MRS เริ่มต้นมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0±0.2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และมีน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมของแต่ละแบคทีเรีย คือ ร้อยละ 2, 4 และ 4 โดยปริมาตรของ N25-7, N25-19 และ TISTR1401 ตามลำดับ เนื่องจากปริมาณการเปลี่ยนรูปจากน้ำมันไปเป็น CLA (Conversion) จากการทดลองที่ผ่านมาค่อนข้างต่ำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังมีกรดไขมันลิโนเลอิกเหลืออยู่มากเกินพอ หลังจากการทดสอบพบว่าการใช้กล้าเชื้อผสมที่เหมาะสมจะส่งเสริมให้เกิดการสร้าง CLA มากกว่าการใช้กล้าเชื้อเดี่ยวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) คือการผสมกล้าเชื้อระหว่าง N25-19 และ TISTR1401 ที่จะทำให้ได้ CLA รวมสูงที่สุด 64.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน หรือคิดเป็นร้อยละการเปลี่ยนรูป 6.45 โดยมี

CLA1 และ CLA2 ปริมาณ 26.66 และ 37.82 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.16 ส่วนการผสมกล้าเชื้อระหว่าง N25-7 และ N25-19, N25-7 และ TISTR1401 หรือ การผสมระหว่างกล้าเชื้อ N25-7, N25-19 และ TISTR1401 ไม่มีผลในการเพิ่มปริมาณการสร้าง CLA เมื่อเทียบกับการใช้กล้าเชื้อเดี่ยว ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าไม่เกิดลักษณะการส่งเสริมหรือการแข่งขันการสร้าง CLA ของแต่ละเชื้อ สำหรับการใช้กล้าเชื้อเดี่ยวพบว่าแบคทีเรีย TISTR1401 สร้าง CLA ได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบเฉพาะกลุ่มการใช้กล้าเชื้อเดี่ยว สามารถสร้าง CLA ได้ปริมาณ 57.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน ประกอบด้วย CLA1 และ CLA2 ปริมาณ 23.98 และ 33.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน ตามลำดับ

4.5 ศึกษาการผลิต CLA ในระบบถังหมักแบบเป็นชุด (Batch fermentation) ในระดับห้องปฏิบัติการ

ศึกษาการผลิต CLA ในระบบถังหมักแบบเป็นชุด (Batch fermentation) โดยคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้าง CLA ได้สูงเพียงสายพันธุ์เดียวมาทดสอบเพื่อติดตามปริมาณการสร้าง CLA จากน้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลืองที่ระยะเวลาต่าง ๆ ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลระยะเวลาในการบ่มที่เกิดการสะสมของ CLA สูงที่สุด สายพันธุ์แบคทีเรียที่นำมาทดสอบคือ TISTR1401 โดยเลี้ยงให้เชื้อเจริญในสภาวะปิดไม่มีการถ่ายเทของอากาศเพื่อลดปริมาณออกซิเจนในระบบ ด้วยอาหารเหลว Modified MRS ปริมาตร 5 ลิตร ที่มีน้ำมันดอกทานตะวัน หรือน้ำมันถั่วเหลืองเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ขนาดหยดน้ำมัน 0.64 ไมโครเมตร ใช้กล้าเชื้ออายุ 18-20 ชั่วโมง ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่เสริมกรดไขมันลิโนเลอิก ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^6-10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณร้อยละ 4 โดยปริมาตร (Inoculum size) ควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ 7.0±0.2 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส และกวนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ตลอดการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

จากที่ได้เลี้ยงแบคทีเรีย TISTR1401 ในอาหารที่มีน้ำมันดอกทานตะวัน (รูปที่ 4.20) พบว่าแบคทีเรียเริ่มมีการสร้าง CLA ตั้งแต่ 2 ชั่วโมงแรกของการบ่ม เนื่องจากใช้เชื้อที่มีอายุในระยะ Late log phase ซึ่งจะเป็นอายุที่มีการสร้าง CLA อย่างรวดเร็ว และทนต่อความเป็นพิษของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ (Kim and Liu, 2002) จากนั้นเชื้อจะเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ที่ 4 ชั่วโมงแรกของการบ่ม เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงมีสารอาหารอย่างจำกัด จึงมีการเจริญในระยะเพิ่มจำนวน (Log phase) ที่สั้นและเข้าสู่ระยะคงที่ค่อนข้างเร็ว เมื่อบ่มเป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมงจะเกิดการสะสมของ CLA สูงที่สุด 69.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน หรือคิดเป็นการเปลี่ยนรูปจากน้ำมันเป็น CLA ร้อยละ 7.0 ซึ่งประกอบไปด้วย CLA1 และ CLA2 ปริมาณ 33.51 และ 36.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

ตารางที่ 4.16 ปริมาณการสร้าง CLA จากการใช้กล้าเชื้อผสมเปรียบเทียบกับการใช้กล้าเชื้อเดี่ยว

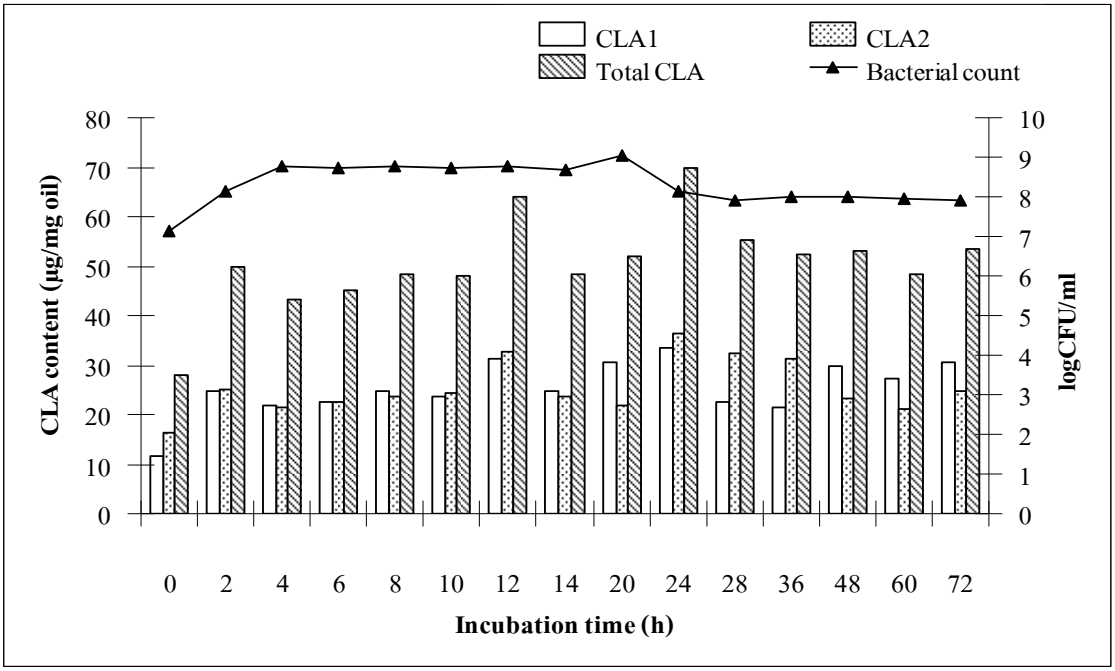
Isolate code	Bacterial count (logCFU/ml)		pH 48 h	CLA content (µg/mg oil)			Conversion (%)
	0 h	48 h		CLA1*	CLA2**	Total	
N25-7	5.86	8.26	6.73±0.02	17.93±0.63^{a}	26.71±2.00^{ab}	44.64±1.37^{a}	4.46
N25-19	6.40	8.28	6.81±0.01	17.46±1.40^{a}	24.55±3.40^{a}	42.01±4.80^{a}	4.20
TISTR1401	5.68	7.98	6.82±0.00	23.98±0.44^{bc}	33.71±0.10^{bc}	57.69±0.54^{bc}	5.77
N25-7+ N25-19	6.32	8.30	6.76±0.00	23.81±4.14^{bc}	34.22±7.04^{bc}	58.03±11.17^{bc}	5.80
N25-7+ TISTR1401	5.93	8.26	6.80±0.01	20.26±0.84^{ab}	28.81±0.02^{ab}	49.07±0.82^{ab}	4.91
N25-19+ TISTR1401	6.58	7.63	6.81±0.01	26.66±1.43^{c}	37.82±1.65^{c}	64.48±3.09^{c}	6.45
N25-7+ N25-19+ TISTR1401	6.43	7.85	6.77±0.02	20.38±0.83^{ab}	30.65±0.66^{abc}	51.03±0.17^{ab}	5.10

หมายเหตุ CLA1* = *cis*-9,*trans*-11-18:2 + *trans*-10, *cis*-12-18:2

CLA2** = *trans*-9,*trans*-11-18:2

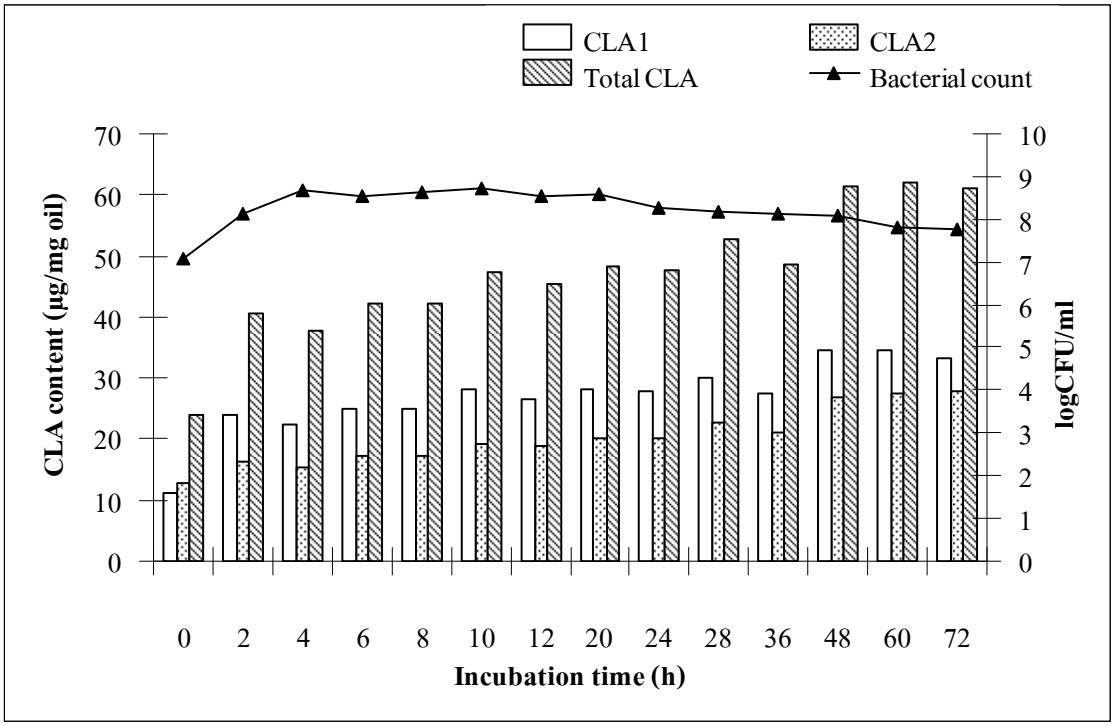
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งของแต่ละไอโซเลทแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

น้ำมัน หรือคิดเป็นร้อยละ 47.91 และ 52.09 ของ CLA ทั้งหมด ตามลำดับ และเมื่อระยะเวลาการบ่มมากขึ้นปริมาณ CLA สะสมเริ่มคงที่ และมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลง จึงเป็นไปได้ว่าจะไม่มีการสร้าง CLA เพิ่มขึ้นเมื่อเชื้อไม่มีการเจริญ หรือมีอัตราการตายมากกว่าการเจริญ (Death phase)



รูปที่ 4.20 ปริมาณการเจริญเติบโต และการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Modified MRS ที่มีน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย TISTR1401 ในอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลืองจะพบลักษณะการเจริญเช่นเดียวกับการเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันดอกทานตะวัน ดังแสดงในรูปที่ 4.21 คือ จะมีระยะเพิ่มจำนวนที่สั้นและจะเข้าสู่ระยะคงที่ที่ 4 ชั่วโมงแรกของการบ่ม และมีการสร้าง CLA เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 2 ชั่วโมงแรกของการบ่ม การสะสม CLA จะมีมากที่สุดเมื่อบ่มนาน 48 ชั่วโมง ปริมาณ 61.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน หรือคิดเป็นการเปลี่ยนรูปจากน้ำมันเป็น CLA ร้อยละ 6.13 ประกอบด้วย CLA1 และ CLA2 ปริมาณ 34.51 และ 26.77 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน หรือคิดเป็นร้อยละ 56.32 และ 43.68 ตามลำดับ และไม่มีการสร้าง CLA หลังจากบ่มนาน 48 ชั่วโมง ข้อดีที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และมีการกวนเพื่อให้เกิดการสัมผัสระหว่างเซลล์กับสับเสตรทได้มากขึ้นนั้นคือจะทำให้เชื้อเกิดการสร้าง CLA1 ได้มากกว่า CLA2 ซึ่งแตกต่างจากการเลี้ยงในขวดทดลองที่จะไม่มีการปั่นกวนมีการผลิต CLA2 มากกว่า CLA1 เสมอ



รูปที่ 4.21 ปริมาณการเจริญเติบโต และการสร้าง CLA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ TISTR1401 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Modified MRS ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การที่แบคทีเรียกรดแล็กติกมีการสร้าง CLA จากน้ำมันค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับการผลิตโดยใช้กรดไขมันโนเลอิกในรูปอิสระในงานวิจัยที่ผ่านมา เนื่องจากความจำเพาะของเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรสที่แบคทีเรียกรดแล็กติกสร้างขึ้นเป็นหลัก ที่เฉพาะเจาะจงกับกรดไขมันลิโนเลอิกที่มีหมู่คาร์บอกซิลอิสระ (Free carboxyl group) (Kepler, Tucker, and Tove, 1970, quoted in Khanal and Dhiman, 2004) แต่กรดไขมันลิโนเลอิกที่อยู่ในน้ำมันจะอยู่ในรูปไทร-, ได- หรือโมโนกลีเซอร์ไรด์ ซึ่งหมู่คาร์บอกซิลจะทำพันธะอยู่กับกลีเซอรอล ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาที่บริเวณหมู่คาร์บอกซิลได้ กิจกรรมของเอนไซม์จึงลดลงส่งผลให้มีการสร้าง CLA ได้น้อยกว่าการใช้กรดไขมันลิโนเลอิกในรูปอิสระ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณ CLA ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักคือ 69.95 มิลลิกรัมกรัมต่อกรัมน้ำมันดอกทานตะวัน และ 61.28 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมันถั่วเหลืองเป็นปริมาณที่มากกว่าการศึกษาการผลิต CLA จากน้ำมันโดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำมันดอกทานตะวันด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติกในงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการที่ผ่านมาถึง 5.6-6.6 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 4.17 คือ การศึกษาของ Puniya et al. (2008) พบว่า *Lactobacillus brevis* 02 ที่แยกได้จากกระเพาะหมักของวัวสามารถสร้าง CLA ได้สูงที่สุด 10.53 มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่

เตรียมจากหางนม (Skim milk medium) ที่มีน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระยะเวลาในการบ่มนาน 12 ชั่วโมง การศึกษาของ Puniya et al. (2009) พบว่า *Lactobacillus casei* สามารถสร้าง CLA ได้สูงที่สุด 11.0 มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน จากน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงใน Skim milk medium นาน 12 ชั่วโมง และ Kim and Liu (2002) ศึกษาการผลิต CLA จากน้ำมันดอกทานตะวันของ *Lactococcus lactis* IO-1 พบปริมาณการผลิตสูงสุด 11.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมไขมัน จากน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นอกจากนี้มีการศึกษาการผลิต CLA จากน้ำมันดอกทานตะวันด้วยแบคทีเรียกลุ่มอื่น คือ *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* ซึ่งพบว่าจะผลิต CLA ได้สูงที่สุด 78.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากน้ำมันดอกทานตะวันเข้มข้น 12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็นความเข้มข้นเพียง 6.57 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS นาน 36 ชั่วโมง (Wang, Lv, Chu, Cui, and Ren, 2007) ส่วนการศึกษาการผลิต CLA จากน้ำมันเมล็ดละหุ่ง ซึ่งมีกรดไขมันไรซิโนเลอิกสูงด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก พบว่า *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a จะผลิต CLA ได้เพียง 2.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมันละหุ่ง แต่เมื่อเติมเอนไซม์ไลเปสลงไปในระบบจะทำให้เกิดการสร้าง CLA ได้ถึง 285 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมันละหุ่ง ประกอบด้วย *cis*-9, *trans*-11-18:2 ปริมาณ 47.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมัน และ *trans*-9, *trans*-11-18:2 ปริมาณสูงถึง 237.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมัน (Kishino et al., 2002) นอกจากนั้น *Lactobacillus plantarum* JCM 1551 สามารถผลิต CLA จากน้ำมันละหุ่งที่มีการเติมเอนไซม์ไลเปส (Lipase M “Amano” 10) ได้สูงถึง 250 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมัน หรือคิดเป็นร้อยละ 25 ซึ่งมีปริมาณ *cis*-9, *trans*-11-18:2 ประมาณร้อยละ 46.67 และ *trans*-9, *trans*-11-18:2 ร้อยละ 53.33 (Ando et al., 2004)

การศึกษาทั้งหมดที่ได้กล่าวมานี้เป็นการศึกษาการผลิต CLA ในขวดทดลองซึ่งขาดการควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และไม่มีการปั่นกวนทำให้ลดการสัมผัสของเซลล์กับสับเสตรท จึงเป็นข้อด้อยที่ทำให้ได้ปริมาณการผลิต CLA ต่ำกว่า ดังนั้นกระบวนการผลิต CLA ในงานวิจัยนี้จึงมีข้อได้เปรียบที่ทำให้ได้ปริมาณการผลิต CLA สูงกว่าคือ 1) ได้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการสร้าง CLA จากน้ำมันพืชโดยตรง 2) องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่มีผลในการบังคับให้เกิดการสร้าง CLA สูงขึ้น 3) การเตรียมน้ำมันให้เป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำทำให้น้ำมันละลายได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และมีความคงตัวสูงมากขึ้นไม่เกิดการแยกชั้นของน้ำมันกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้น้ำมันสัมผัสกับเซลล์ซึ่งช่วยให้เอนไซม์จับและทำปฏิกิริยากับสับเสตรทได้ดีขึ้น และ 4) การเลี้ยงเชื้อในระบบถังหมักที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นการปรับให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรสตลอดการผลิต และยังมีการปั่นกวนทำให้เซลล์สัมผัสกับสับเสตรทตลอดเวลา เป็นผลรวมให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง CLA สูงได้ นอกจากนั้นการผลิต CLA ด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติกในระบบถังหมักยัง

สามารถทำได้ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากไม่จำเป็นต้องควบคุมให้สภาวะในถังหมักเป็นแบบไร้ออกซิเจน แบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน และมีข้อมูลรายงานชัดเจนว่าปริมาณออกซิเจนไม่ส่งผลต่อปริมาณการสร้าง CLA ทั้งหมด แต่การเลี้ยงในสภาวะ Aerobic จะส่งผลให้มีการสร้างไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 สูงกว่า และมีการสร้างไอโซเมอร์ *trans*-9, *trans*-11-18:2 ต่ำกว่าการเลี้ยงในสภาวะ Microaerobic และ Anaerobic ด้วย (Macouzet, Lee, and Robert, 2009)

ตารางที่ 4.17 เปรียบเทียบปริมาณการสร้าง CLA จากน้ำมันที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกสูงของแบคทีเรียแต่ละชนิด

Species	**Substrate**	**CLA content (mg/g oil)**	**Reference**
Lactococcus lactis TISTR1401	Sunflower oil	69.95	This research
	Soybean oil	61.28	
Lactobacillus brevis 02	Sunflower oil	10.53	Puniya et al. (2008)
Lactobacillus casei	Sunflower oil	11	Puniya et al. (2009)
Lactococcus lactis IO-1	Sunflower oil	11	Kim and Liu (2002)
Propionibacterium freudenreichii ssp. *shermanii*	Sunflower oil	6.57	Wang et al. (2007)
Lactobacillus plantarum AKU 1009a	Castor oil	2.50	Kishino et al. (2002)
	Castor oil+lipase	285	
Lactobacillus plantarum JCM 1551	Castor oil+lipase	250	Ando et al. (2004)

แต่อย่างไรก็ตามผลการผลิต CLA ในงานวิจัยนี้ยังมีข้อด้อยคือจะได้ปริมาณ CLA2 สูงซึ่งเป็น CLA ไอโซเมอร์ที่ไม่ต้องการให้เกิดขึ้นในการผลิต ปัจจุบันยังไม่มีกระบวนการแยก CLA1 ออกจาก CLA2 ที่สามารถทำได้ในเชิงการผลิตเพื่อการค้า ดังนั้นการศึกษาเพื่อทราบกลไกการทำงานของเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์เรสที่ทำให้เกิดการสร้างเฉพาะ CLA1 และการทดสอบสภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง, อุณหภูมิบ่ม, ชนิดของน้ำมัน, ปริมาณออกซิเจน และลักษณะการเลี้ยงเชื้อ คือ การเลี้ยงในขวดทดลอง และการเลี้ยงในระบบถังหมักที่มีการปั่นกวนตลอดเวลา ที่ส่งเสริมการสร้าง CLA1 เป็นแนวทางการผลิตไอโซเมอร์เฉพาะที่ต้องการได้ นอกจากนั้นอาจใช้เทคนิคการตัด

ต่อพันธุกรรมที่เกี่ยวกับการสร้าง CLA ของแบคทีเรียชนิดอื่นที่สามารถสร้าง เฉพาะไอโซเมอร์ *cis*-9, *trans*-11-18:2 หรือ *cis*-9, *trans*-11-18:2 และ *trans*-10, *cis*-12-18:2 ร่วมกันมาไว้อยู่ในแบคทีเรียกรดแล็กติก ซึ่งจะได้การผลิต CLA ไอโซเมอร์ที่ต้องการ พร้อมกับการใช้แบคทีเรีย ที่ปลอดภัยต่อมนุษย์

บทที่ 5
บทสรุป

แบคทีเรียกรดแล็กติกจำนวน 17 ไอโซเลท และที่ทราบสายพันธุ์จำนวน 2 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบสามารถสร้าง CLA ได้จากน้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลืองที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกสูง เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว Modified MRS ที่มีปริมาณของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนอย่างจำกัด ซึ่งเมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย พบว่า การสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียกรดแล็กติกไม่เกี่ยวข้องกับปริมาณการสร้าง CLA และเมื่อนำแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีศักยภาพในการสร้าง CLA ได้แก่ N25-7, N25-19 และ TISTR1401 มาตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้าง CLA พบว่า ความเข้มข้นของน้ำมัน ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น อุณหภูมิบ่ม และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อปริมาณการสร้าง CLA ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในแต่ละปัจจัยจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และจากการทดลองใช้กล้าเชื้อผสมในการผลิต CLA ทำให้ทราบว่าการใช้กล้าเชื้อผสมที่เหมาะสมจะทำให้เกิดการส่งเสริมการสร้าง CLA ได้มากกว่าการใช้กล้าเชื้อเดี่ยวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อทดสอบการผลิต CLA ของแบคทีเรีย TISTR1401 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้าง CLA ได้สูงที่สุด ในระบบถังหมักแบบเป็นชุดเพื่อติดตามปริมาณการสะสมของ CLA โดยควบคุมปัจจัยการผลิตต่าง ๆ ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่า การใช้น้ำมันดอกทานตะวันเป็นสารตั้งต้นจะผลิต CLA ได้สูงที่สุด 69.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน หรือคิดเป็นการเปลี่ยนรูปจากน้ำมันไปเป็น CLA ร้อยละ 7.0 ประกอบด้วย CLA1 และ CLA2 ร้อยละ 47.91 และ 52.09 ตามลำดับ ส่วนการใช้น้ำมันถั่วเหลือง เป็นสารตั้งต้นจะได้ปริมาณการผลิต CLA สูงสุด 61.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำมัน หรือคิดเป็นการเปลี่ยนรูปร้อยละ 6.13 ของน้ำมันทั้งหมด ประกอบด้วย CLA1 และ CLA2 ร้อยละ 56.32 และ 43.68 ตามลำดับ ดังนั้นปัจจัยที่สำคัญในการผลิต CLA จากน้ำมันที่มีกรดไขมันลิโนเลอิกสูงได้แก่ สายพันธุ์ของแบคทีเรีย การผสมสายพันธุ์ของเชื้อที่เหมาะสม อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของน้ำมัน และสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

รายการอ้างอิง

Aldai, N., Murray, B. E., Nájera, A. I., Troy, D. J. and Osoro, K. (2005). Review: Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 85: 1073-1083.

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. **Journal of Dairy Science** 86: 1941-1946.

Ando, A., Ogawa, J., Kishino, S. and Shimizu, S. (2003). Conjugated linoleic acid production from ricinoleic acid by lactic acid bacteria. **Journal of American Oil Chemists' Society** 80: 889–894.

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

Atlas, R. M. (2004). **Handbook of microbiology media**. Boca Raton: CRC Press.

Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S. and von Wright, A. (eds.). **Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects** (2nd ed., pp. 1-72). Marcel Dekker Inc, New York.

Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S. and von Wright, A. and Ouwehand, A. (eds.). **Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects** (3rd ed., pp. 1-66). Marcel Dekker Inc, New York.

Aydin, R. (2005). Conjugated linoleic acid: Chemical structure, sources and biological properties. **Turkey Journal** 29: 189-195.

Bauman, D. E., Baumgard, L. H., Corl, B. A. and Griinari, J. M. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Proceedings of the American Society of Animal Science** 1–15.

Belury, M. A. (2002a). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. **Annual Review of Nutrition** 22: 505-531.

Belury, M. A. (2002b). Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. **Journal of Nutrition** 132: 2995-2998.

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. **Livestock Production Science** 63: 201-211.

Blankson, H., Stakkestad, J. A., Fagertun, H., Thom, E., Wadstein, J. and Gudmundsen, O. (2000). Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. **Journal of Nutrition** 130: 2943-2948.

Christie, W. W., Dobson, G. and Adlof, R. (2007). A practical guide to the isolation, analysis and identification of conjugated linoleic acid. **Lipids** 42: 1073-1084.

Christie, W. W., Sébédio, J. L. and Juanéda, P. (2001). A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid (CLA). **INFORM** 12: 147-152

Chin, S. F., Liu, W., Storkson, J. M., Ha, Y. L. and Pariza, M. W. (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinagens. **Journal of Food Composition and Analysis** 5: 185–197.

Collomb, M., Schimd, A., Sieber, R., Wechsler, D. and Ryhänen, E.-L. (2006). Conjugated linoleic acids in milk fat: variation and physiological effects. **International Dairy Journal** 16: 1347-1361.

Collomb, M., Sollberger, H., Bütikofer, U., Sieber, R., Stoll, W. and Schaeren, W. (2004). Impact of a basil diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflower seed on the fatty acid composition of milk fat. **International Dairy Journal** 14: 549-559.

Coakley, M., Ross, R. P., Nordgren, M., Fitzgerald, G., Devery, R. and Stanton, C. (2003). Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. **Journal of Applied Microbiology** 94: 138-145.

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

de la Fuente, M. A., Luna, P. and Juárez, M. (2006). Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. **Trends in Analytical Chemistry** 25: 917-926.

Delmonte, P., Kataoka, A., Corl, B. A., Bauman, D. E. and Yurawecz, M. P. (2005). Relative retention order of all isomers of *cis*/*trans* conjugated linoleic acid FAME from the 6, 8- to 13, 15-positions using silver ion HPLC with two elution systems. **Lipids** 40: 509-514.

Delmonte, P., Roach, J. A. G., Mossoba, M. M., Losi, G. and Yurawecz, M. P. (2004). Synthesis, isolation, and GC analysis of all the 6, 8- to 13, 15-*cis*, *trans* conjugated linoleic acid. **Lipids** 39: 185-191.

Devriese, L. A. and Pot, B. (1995). The genus *Enterococcus*. In Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H. (eds.). **The genera of lactic acid bacteria** (pp. 327-367). Chapman and Hall, Glasgow.

Dhiman, T. R., Anand, G. R., Satter, L. D. and Pariza, M. W. (1999). Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. **Journal of Dairy Science** 82: 2146-2156.

Dong, M. and Qi, S. (2006). Conjugated linoleic acid production by fermentation. **International Journal of Food Engineering** 2(4): 1-14.

El-Sawah, M. M. A., Sherief, A. A. and Bayoumy, S. M. (1995). Enzymatic properties of lipase and characteristics production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Antonie van Leeuwenhoek** 67: 357-362.

Gammill, W., Proctor, A. and Jain, V. (2010). Comparative study of high-linoleic acid vegetable oils for the production of conjugated lnoleic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 58: 2952-2957.

Gavino, V. C., Gavino, G., Leblanc, M-J. and Tuchweber, B. (2000). An isomer mixture of conjugated linoleic acids but not pure *cis*-9, *trans*-11- octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters. **Journal of Nutrition** 130: 27-29.

Gunstone, F. D. (2002). **Vegetable oils in food technology: Composition, properties and uses**. Blackwell Publishing Ltd., UK.

Hammes, W. P. and Vogel, R. F. (1995). The genus *Lactobacillus*. In Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H. (eds.). **The genera of lactic acid bacteria** (pp. 19-54). Chapman and Hall, Glasgow.

Ip, C., Singh, M., Thompson, H. J. and Scimeca, J. A. (1994). Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. **Cancer Research** 54: 1212-1215.

Jain, V. P., Proctor, A. and Lall, R. (2008). Pilot-scale production of conjugated linoleic acid-rich soy oil by photoirradiation. **Journal of Food Science** 73: E183-E192.

Jiang, J., Björck, L. and Fondén, R. (1998). Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. **Journal of Applied Microbiology** 85: 95-102.

Kelly, M. L., Berry, J. R., Dwyer, D. A., Griinari, J. M., Chouinard, P. Y., Van Amburgh, M. E. and Bauman, D. E. (1998). Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. **Journal of Nutrition** 128: 881-885.

Khanal, R. C. and Dhiman, T. R. (2004). Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A review. **Pakistan Journal of Nutrition** 3: 72-81.

Kim, E.-Y., Kim, Y.-H., Rhee, M.-H., Song, J.-C., Lee, K.-W., Kim, K.-S., Lee, S.-P., Lee, I.-S. and Park, S.-C. (2007). Selection of *Lactobacillus* sp. PSC101 that produces active dietary enzymes such as amylase, lipase, phytase and protease in pigs. **Journal of General and Applied Microbiology** 53: 111-117.

Kim, Y. J. (2003). Partial inhibition of biohydrogenation of linoleic acid can increase the conjugated linoleic acid production of *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51: 4258-4262.

Kim, Y. J., Lee, K. W., Lee, S., Kim, H. and Lee, H. J. (2003). The production of high-purity conjugated linoleic acid (CLA) using two-step urea-inclusion crystallization and hydrophilic arginine-CLA complex. **Journal of Food Science** 68: 1948-1951.

Kim, Y. J. and Liu, R. H. (2002). Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. **Journal of Food Science** 67: 1731-1737.

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. **Applied and Environmental Microbiology** 66: 5226-5230.

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*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 66: 2283-2286.

Kishino, S., Ogawa, J., Omura, Y., Matsumura, K. and Shimizu, S. (2002). Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. **Journal of American Oil Chemists' Society** 79: 159-163.

Kramer, J. K. G., Fellner, V., Dugan, M. E. R., Sauer, F. D., Mossoba, M. M. and Yurawecz, M. P. (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes ant total trans fatty acids. **Lipids** 32: 1219-1228.

Kramer, J. K. G., Parodi, P. W., Jensen, R. G., Mossoba, M. M., Yurawecz, M. P. and Adlof, R. O. (1998). Rumenic acid: a proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. **Lipids** 33: 835.

Kritchevsky, D. (2000). Conjugated linoleic acid (review). **Nutrition Bulletin** 25: 25-27.

Lee, S.-O., Hong, G.-W. and Oh, D.-K. (2003). Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid by immobilized *Lactobacillus rueteri*. **Biotechnology Progress** 19: 1081-1084.

Lee, S. O., Kim, C. S., Cho, S. K., Choi, H. J., Ji, G. E. and Oh, D.-K. (2003). Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid during fermentation and by washed cells of *Lactobacillus reuteri*. **Biotechnology Letters** 25: 925-938.

Lin, H., Boylston, T. D., Chang, M. J., Luedecke, L. O. and Shultz, T. D. (1995). Survey of conjugated linoleic acid contents of dairy products. **Journal of Dairy Science** 78: 2358-2365.

Lin , T. Y. (2006). Conjugated linoleic acid production by cells and enzyme extracts of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* with additions of different fatty acids. **Food Chemistry** 94: 437-441.

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 Chemistry** 92: 23-28.

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

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*. **Journal of Food Science** 64: 1502-1505.

Liu, W., Sun, D., Li, C., Liu, Q. and Xu, J. (2006). Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Journal of colloid and Interface Science** 303: 557-563.

Macouzet, M., Lee, B. H. and Robert, N. (2009). Production of conjugated linoleic acid by probiotic *Lactobacillus acidophilus* La-5. **Journal of Applied Microbiology** 106: 1886-1891.

MacDonald, H. B. (2000). Conjugated linoleic acid and disease prevention: A review of current knowledge. **Journal of the American College of Nutrition** 19: 111S-118S.

Medina, R. B., Katz, M. B., González, S. and Oliver,G. (2004). Determination of esterolytic activities of lactic acid bacteria. In Spencer, J. F. T. and Ragout de Spencer, A. L. (eds.). **Public-health microbiology: Methods and protocols** (pp. 465-470). Humana Press Inc., Iotowa, NJ.

Mozaffarian, D., Katan, M. B., Ascherio, A., Stampfer, M. J. and Willett, W. C. (2006). Trans fatty acids and cardiovascular disease. **New England Journal of Medicine** 354: 1601-1613.

Mulvihill, B. (2001). Ruminant meat as a source of conjugated linoleic acid (CLA). **Nutrition Bulletin** 26: 295-299.

Navarro, V., Zabala, A., Macarulla, M. T., Fernández-Quintela, A., Rodríguez, V. M., Simón, E. and Portillo, M. P. (2003). Effects of conjugated linoleic acid on body fat accumulation and serum lipids in hamsters fed an atherogenic diet. **Journal of Physiology and Biochemistry** 59: 193-199.

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

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*. **Applied and Environmental Microbiology** 67(3): 1246-1252.

Park, Y., Albright, K. J., Cai, Z. Y. and Pariza, M. W. (2001). Comparison of methylation procedures for conjugated linoleic acid and artifact formation by commercial (trimethylsilyl)diazomethane. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49: 1158-1164.

Park, Y. and Pariza, M. W. (2007). Mechanism of body fat modulation by conjugated linoleic acid. **Food Research International** 40: 311–323.

Park, Y., Strokson, J. M., Albright, K. J., Kiu, W. and Pariza, M. W. (1999). Evidence that the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. **Lipids** 34: 235-241.

Puniya, A. K., Chaitanya, S., Tyagi, A. K., De, S. and Singh, K. (2008). Conjugated linoleic acid producing potential of lactobacilli isolated from the rumen of cattle. **Journal of India Microbiology and Biotechnology** 35: 1223-1228.

Puniya, A. K., Reddy, C. S., Kumar, S. and Singh, K. (2009). Influence of sunflower oil on conjugated linoleic acid production by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. **Annals of Microbiology** 59: 505-507.

Roach, J. A. G., Mossoba, M. M., Yurawecz, M. P. and Kramer, J. K. G. (2002). Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. **Analytica Chimica Acta** 465: 207-226.

Segall, K. I. and Goff, H. D. (1999). Influence of adsorbed milk protein type and surface concentration on the quiescent and shear stability of butter oil emulsions. **International Dairy Journal** 9: 683-689.

Sehat, N., Rickert, R., Mossoba, M. M., Kramer, J. K. G., Yurawecz, M. P., Roach, J. A. G., Adlof, R. O., Morehouse, K. M., Fritsche, J., Eulitz, K. D., Steinhart, H. and Ku, Y. (1999). Improved separation of conjugated fatty acid methyl esters by silver ion high-performance liquid chromatography. **Lipids** 34: 407-413.

Sehat, N., Yurawecz, M. P., Roach, J. A. G., Mossoha, M. M., Kramer, J. K. G. and Ku, Y. (1998). Silver-ion high performance liquid chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid. **Lipids** 33: 217-221.

Shantha, N. C., Crum, A. D. and Decker, E. A. (1994). Evaluation of conjugated linoleic acid concentrations in cooked beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 42:1757-1760.

Shantha, N. C., Ram, L. N., O'Leary, J., Hicks, C. L. and Decker, E. A. (1995). Conjugated linoleic acid concentrations in dairy products as affected by processing and storage. **Journal of Food Science** 60: 695-697.

Simpson, W. J. and Taguchi, H. (1995). The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*. In Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H. (eds.). **The genera of lactic acid bacteria** (pp. 125-172). Chapman and Hall, Glasgow.

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*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** 10: 357-361.

Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology** 36: 1-29.

Teuber, M. (1995). The genus *Lactococcuss*. In Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H. (eds.). **The genera of lactic acid bacteria** (pp. 173-234). Chapman and Hall, Glasgow.

Van Nieuwenhove, C. P., Oliszewski, R. Gonzalez, S. N. and Pérez Chaia, A. B. (2007). Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk. **Letters in Applied Microbiology** 44: 467-474.

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 Chemistry** 103: 313-318.

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 acid. **Journal of Applied Microbiology** 105: 2239-2247.

Yang, L., Huang, Y., Wang, H. Q. and Chen, Z-Y. (2002). Production of conjugated linoleic acid through KOH-catalyzed dehydration of ricinoleic acid. **Chemistry and Physics of Lipids** 119: 23-31.

Yang, T-S. and Liu, T-T. (2004). Optimization of production of conjugated linoleic acid from soybean oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52: 5079-5084.

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

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

1.1 De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) broth (Himedia Laboratory Pvt. Ltd., India)

Proteose peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Polysorbate 80	1.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulphate	0.1	กรัม
Manganese sulphate	0.05	กรัม
di-Potassium phosphate	2.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ละลายผงอาหารสำเร็จรูปด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารเหลว MRS ดัดแปลง (Modified MRS broth)

Proteose peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Polysorbate 80	1.0	กรัม
Ammonium citrate ($(NH_4)_2C_6H_6O_7$)	2.0	กรัม
Sodium acetate ($NaCH_3COO$)	5.0	กรัม
Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.1	กรัม
Manganese sulphate ($MnSO_4.4H_2O$)	0.05	กรัม
di-Potassium phosphate (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดให้เข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0±0.2 ด้วยสายละลาย Sodium hydroxide และ/หรือ Hydrochloric acid จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อ โดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 Lipase test agar (Tween 80 agar) (Atlas, 2004)

Peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5.0	กรัม
Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$)	0.1	กรัม
Polysorbate 80 (Tween 80®)	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 7.0±0.2 ด้วยสายละลาย Sodium hydroxide และ/หรือ Hydrochloric acid นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยแยกนึ่งฆ่าเชื้อ Polysorbate 80

1.4 Lipase test agar ดัดแปลงสูตรที่ 1 ดัดแปลงจาก Kim et al. (2007); Atlas (2004) และ El-Sawah, Sherief, and Bayoumy (1995)

Peptone	1.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	5.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	0.1	กรัม
$FeSO_4.4H_2O$	0.01	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.1	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5.0	กรัม
Polysorbate 80 (Tween 80®)	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 7.0±0.2 ด้วยสายละลาย Sodium hydroxide และ/หรือ Hydrochloric acid นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยแยกนึ่งฆ่าเชื้อ Polysorbate 80

1.5 Lipase test agar ดัดแปลงสูตรที่ 2 ดัดแปลงจาก Kim et al. (2007); Atlas (2004) และ El-Sawah, Sherief, and Bayoumy (1995)

Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
Manganese sulphate ($MnSO_4.4H_2O$)	0.1	กรัม
Ferrous sulphate ($FeSO_4.4H_2O$)	0.01	กรัม

Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$)	0.1	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5.0	กรัม
Polysorbate 80 (Tween 80®)	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 7.0±0.2 ด้วยสายละลาย Sodium hydroxide และ/หรือ Hydrochloric acid นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยแยกนึ่งฆ่าเชื้อ Polysorbate 80

1.6 สารละลาย Butterfield's buffered phosphate diluent

Stock Buffer Solution:

Potassium dihydrogenphosphate	34.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 7.2-7.4 ที่ 25 องศาเซลเซียส ทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับเป็น Stock buffer solution

Final buffer solution:

Stock buffer solution	1.25	มิลลิลิตร

ผสม Stock buffer solution ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.2-7.4 ที่ 25 องศาเซลเซียส ทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที สำหรับเป็น diluent

1.7 สารละลายกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

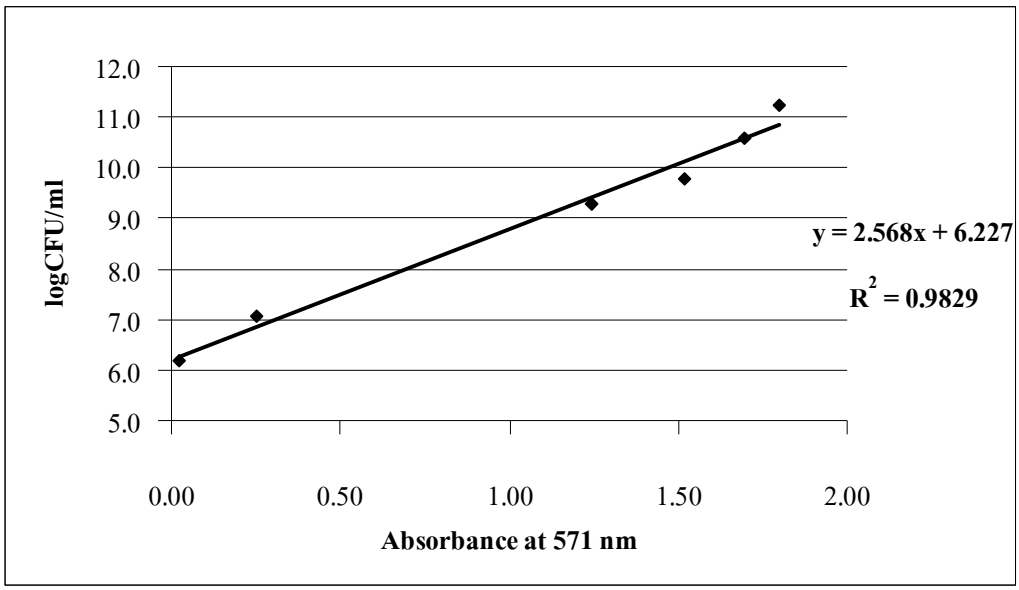
Tween 80®	1.0	กรัม
กรดไขมันลิโนเลอิก (Linoleic acid, 99%)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	98.0	กรัม

ละลาย Tween 80® ในน้ำกลั่น บรรจุในขวดรูปชมพู่ฝาเกลียว ทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติมกรดไขมันลิโนเลอิกลงในสารละลาย Tween 80® ในสภาพปลอดเชื้อ เขย่าอย่างแรงจนเกิดเป็นอิมัลชันสีขาวขุ่น เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกบนอาหารแข็ง MRS ให้ได้โคโลนีเดี่ยว เขี่ยเชื้อลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำอาหารเหลวที่มีเซลล์มาตรวจสอบความยาวคลื่นที่เซลล์สามารถดูดกลืนแสงได้สูงที่สุด ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (BIO-RAD, SmartSpec™ 3000, U.S.A.) โดยใช้อาหารเหลว MRS เป็น Blank

จากนั้นเติมเชื้อที่เหลือลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในปริมาณร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร บ่มในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และนำมาตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค Spread plate ที่เวลาการบ่ม 0, 2, 4, 6, 8 และ 12 ชั่วโมง เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างจำนวนเซลล์กับค่าการดูดกลืนแสงได้ดังรูปที่ ผ1



รูปที่ ผ1 กราฟมาตรฐานของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีเซลล์รูปร่างกลม (Coccus) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 571 นาโนเมตร

3. การทดลองการใช้โซเดียมเมทอกไซด์และโบรอนไทรฟรูออไรด์ในการ Methylation CLA

3.1 แหล่งของ CLA และสารเคมีหลักที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วย

3.1.1 ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ TISTR1401 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.1.2 CLA ทางการค้า 2 ยี่ห้อ ได้แก่ 1) ซี แอล เอ แอดวานซ์ (CLA ADVANCE^{TM}) (บริษัท เมก้า ไลฟ์ไซแอ็นซ์ จำกัด, ประเทศไทย) ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีของน้ำมันดอกทานตะวัน โดยในของเหลว 1,250 มิลลิกรัม จะมี CLA 1,000 มิลลิกรัม และ 2) ฟิกเกอร์ พลัส (Figger Plus) (บริษัท เอฟ.ซี.พี. จำกัด, ประเทศไทย) ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีของน้ำมันดอกคำฝอย โดยในของเหลว 1,000 มิลลิกรัม จะมี CLA 800 มิลลิกรัม

3.1.3 โซเดียมเมทอกไซด์ (97% Sodium methoxide, CH_3NaO, Fluka, Fluka Chemie GmbH CH-9471 Buchs, Germany) ในเมทานอลเข้มข้น 0.5 นอร์มาล

3.1.4 สารละลายอิ่มตัวโซเดียมคลอไรด์

3.1.5 Glacial acetic acid

3.1.6 สารละลายโบรอนไทรฟรูออไรด์ในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 14 (14% Boron trifluoride in methanol) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany)

3.1.7 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอลเข้มข้น 1 นอร์มาล

3.1.8 สารละลาย Heptadecanoic acid ในเฮกเซนเข้มข้น 0.25 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2 วิธีการทดลองการใช้โซเดียมเมทอกไซด์ในการ Methylation CLA (ดัดแปลงจาก Aldai et al. (2005) และ Park et al. (2001))

3.2.1 ตัวอย่าง CLA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

สกัดไขมันตามวิธีการที่ระบุไว้ในข้อ 3.4.1.5 ก1 จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมเมทอกไซด์ในเมทานอลเข้มข้น 0.5 นอร์มาล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พ่นด้วยแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์พร้อมปิดฝาสนิทเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เขย่าให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมกรดอะซีติกเข้มข้น 2-3 หยด และเติมสารละลายอิ่มตัวโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดเมทอกไซด์ที่เหลือ จากนั้นสกัด FAMEs ด้วยเฮกเซนปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสกัดซ้ำด้วยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ เติมผงโซเดียมซัลเฟตเพื่อกำจัดความชื้นที่เหลือออก ละลาย FAMEs ด้วยเฮกเซนบริสุทธิ์ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชาที่ -20 องศาเซลเซียส รอการวิเคราะห์

3.2.2 ตัวอย่าง CLA ทางการค้า

เตรียมสารละลาย CLA ทางการค้าเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเฮกเซน และปิเปตปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมสารละลาย Heptadecanoic acid ในเฮกเซนเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมเมทอกไซด์ในเมทานอลเข้มข้น 0.5 นอร์มาล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร พ่นด้วยแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์พร้อมปิดฝาสนิทและนำไปบ่มตามวิธีการเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระบุในข้อ 3.2.1 โดยเตรียมให้มีตัวอย่าง CLA เข้มข้น 250 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ในเฮกเซน

3.3 วิธีการทดลองการใช้โบรอนไทรฟรูออไรด์ในการ Methylation CLA (ดัดแปลงจาก Alnso, Cuesta, and Gilliland (2003), Xu et al. (2008) และ Park et al. (2001))

3.3.1 ตัวอย่าง CLA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการสกัดไขมัน ย่อยไขมัน และ การ Methylation ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในบทที่ 3 ข้อ 3.4.5ก1, ก2 และ ก3 ตามลำดับ

3.3.2 ตัวอย่าง CLA ทางการค้า

วิธีการเตรียมตัวอย่าง CLA ทางการค้าจะคล้ายกับการเตรียมตัวอย่าง CLA ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเตรียมสารละลาย CLA ทางการค้าเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเฮกเซน และปิเปตปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมสารละลาย Heptadecanoic acid ในเฮกเซนเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอลเข้มข้น 1 นอร์มาล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร พ่นด้วยแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ เขย่าให้สารผสมกัน ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายโบรอนไทรฟรูออไรด์ในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 14 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร พ่นด้วยแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์พร้อมปิดฝาสนิทและเขย่าให้สารผสมกัน ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที โดยเขย่าทุก ๆ 5 นาที จากนั้นเติมน้ำปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และสกัด FAMEs ด้วยเฮกเซนปริมาตร 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ เติมผงโซเดียมซัลเฟตประมาณ 0.1 กรัม จากนั้นเตรียมสารละลายให้มีตัวอย่าง CLA เข้มข้น 250 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ในเฮกเซน เก็บสารละลายในขวดสีชาขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิดฝาสนิท และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอการวิเคราะห์

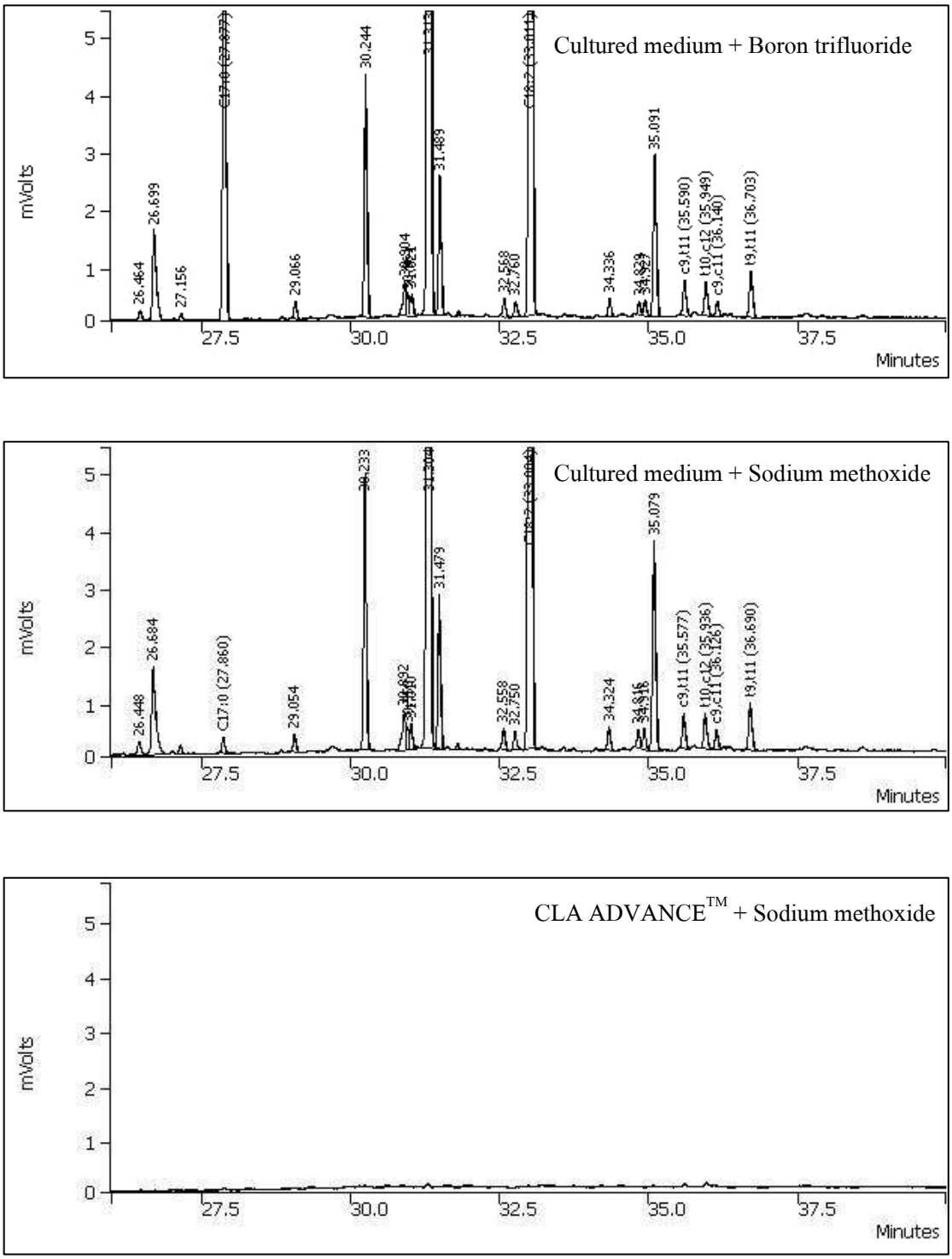
3.4 การตรวจวัดเชิงปริมาณ และคุณภาพของ CLA ด้วยเทคนิค Gas chromatography

ทำการตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการ และสภาวะที่ระบุในบทที่ 3 ข้อ 3.4.5ข

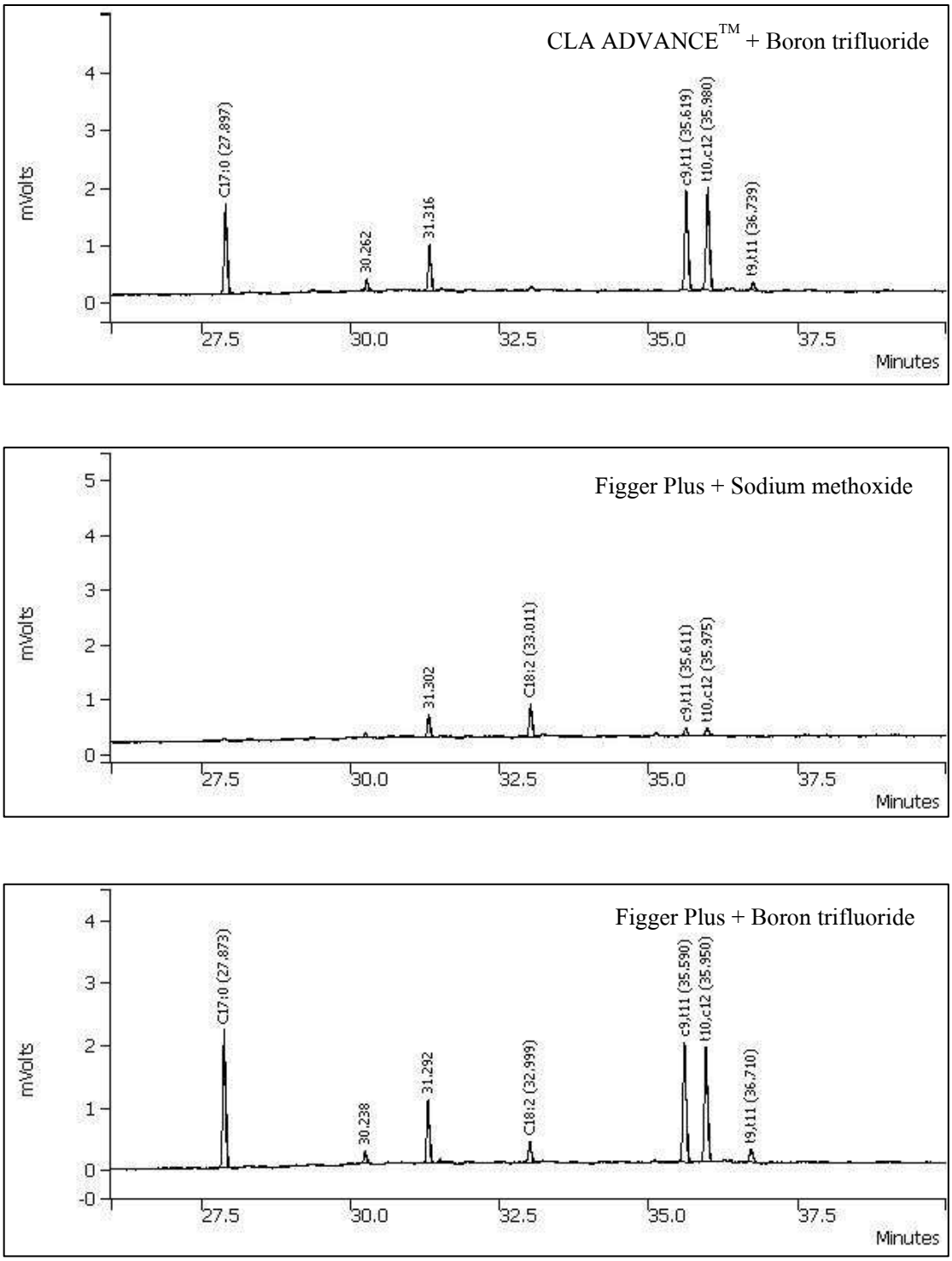
3.5 ผลการวิเคราะห์ CLA ด้วยเทคนิค Gas chromatography

จากการวิเคราะห์ CLA ในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ และ CLA ทางการค้าที่ทำปฏิกิริยา Methylation ด้วยโซเดียมเมทอกไซด์ในเมทานอล และโบรอนไทรฟรูออไรด์ในเมทานอล พบว่าการใช้โซเดียมเมทอกไซด์จะไม่พบพีคของ Heptadecanoic acid และ CLA ในโครมาโทแกรมของ CLA ทางการค้า ดังแสดงในรูปที่ ผ2 เนื่องจาก Heptadecanoic acid และ CLA ทางการค้าที่สังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีจะอยู่ในรูปกรดไขมันอิสระ ซึ่งเป็นข้อจำกัดที่โซเดียมเมทอกไซด์จะไม่สามารถทำปฏิกิริยา Methylation ได้ แต่จะพบพีคของ CLA ในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่ CLA นี้จะอยู่ในรูปเอสเทอร์ และ/หรือ ไทรกลีเซอร์ไรด์

ส่วนการใช้โบรอนไทรฟรูออไรด์จะพบพีคของไขมันทุกชนิด เนื่องจากสารนี้สามารถทำปฏิกิริยา Methylation กับไขมันที่อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระ ฟอสโฟลิปิด และ ไทรกลีเซอร์ไรด์ได้ ทั้งนี้การใช้โบรอนไทรฟรูออไรด์จะพบพีค CLA ในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนกับการใช้โซเดียมเมทอกไซด์ และพบไอโซเมอร์ *trans*-9, *trans*-11-18:2 ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ ผ1 ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าการใช้โบรอนไทรฟรูออไรด์ และสภาวะที่ใช้ในการ Methylation ในงานวิจัยนี้ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปร่างไอโซเมอร์ของ CLA และเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์



รูปที่ ผ2 โครมาโทแกรมบางส่วนของ CLA ในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ และ CLA ทางการค้า เมื่อทำปฏิกิริยา Methylation ด้วยโซเดียมเมทอกไซด์ หรือโบรอนไทรฟลูออไรด์



รูปที่ ผ2 (ต่อ) โครมาโทแกรมบางส่วนของ CLA ในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ และ CLA ทางการค้า เมื่อทำปฏิกิริยา Methylation ด้วยโซเดียมเมทอกไซด์ หรือโบรอนไทรฟลูออไรด์

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอ้อยนภา แซ่ลิ้ม เกิดเมื่อวันที่ 28 เมษายน พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ศึกษาในระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนธนาคารออมสิน และโรงเรียนบ้านหนองจันทร์ จากนั้นศึกษาต่อในระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนชัยเกษมวิทยา และจบการศึกษาในปีการศึกษา 2544 ในปีการศึกษา 2545 ได้รับการคัดเลือกประเภทโควตาให้ศึกษาต่อในระดับปริญญาตรี สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และสามารถผ่านการคัดเลือกเข้าเรียนในสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร และสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง) ในปีการศึกษา 2548 ต่อจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2549