บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจของไทยและเป็นพืชที่สามารถใช้ทำอาหารได้หลายชนิดและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ราคาถูก มีวิธีการเตรียมง่าย สามารถทำได้ทั้งในครัวเรือนและในระดับอุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากถั่วเหลืองก็เป็นที่นิยมในการบริโภคกันอย่างแพร่หลาย เช่น ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว และ ถั่วงอกดอง เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากถั่วเหลืองที่ทำขึ้นเพื่อบริโภคในชุมชนเล็กๆและไม่แพร่กระจายไปแพร่หลายมากนัก ได้แก่ ถั่วเน่า ซึ่งเป็นอาหารหมักที่ทำขึ้นเพื่อบริโภคสำหรับคนแถบภาคเหนือ โดยเฉพาะมีถิ่นกำเนิดมาจากชาวไทยภูเขาทำขึ้นมาบริโภค มีในจังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย และ แม่ฮ่องสอน เป็นต้น

การหมักถั่วเหลืองจะช่วยในเรื่องการย่อยให้ดีขึ้นเพราะโปรตีนในถั่วเหลืองจะถูกย่อยให้เป็นกรดอะมิโนโดยการหมักซึ่งอาศัยพวกจุลินทรีย์ที่เหมาะสม พวก trypsin inhibitor และ hemagglutinin จะถูกทำลายโดยความร้อนจากไอน้ำ หรือต้มในน้ำเดือด ซึ่งเป็นกระบวนการที่จำเป็นก่อนจะเริ่มกระบวนการหมัก นอกจากนี้การหมักจะช่วยกำจัดกลิ่นถั่วเหลืองให้หมดไปได้เนื่องจากกลิ่นของถั่วเหลืองที่เกิดจากสารพวก carboxyl compound พวก xexanol และ pentanol ซึ่งเป็นกลิ่นที่บุคคลทั่วไปไม่ชอบ (สมชาย, 2533)

วิธีการทำถั่วเน่าเป็นการหมักตามวิธีพื้นบ้านมีดังนี้ (รสวิไล, 2526)

1. ล้างถั่วเหลืองด้วยน้ำสะอาด เพื่อกำจัดสิ่งสกปรก
2. ต้มถั่วเหลืองเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ขณะต้มต้องคอยเติมน้ำให้ระดับน้ำท่วมเมล็ดถั่วเสมอ โดยมีอัตราส่วนโดยประมาณคือ ถั่วเหลือง 1 ลิตรต่อน้ำ 2 ลิตร
3. หลังจากต้มแล้วผึ่งให้แห้ง
4. ทำการหมักโดยเตรียมตะกร้ารองด้วยใบตอง แล้วนำถั่ววางบนใบตองปิดทับด้วยใบตองอีกชั้นหนึ่งเพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้นและป้องกันการแปดเปื้อนจากเชื้อรา
5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 วัน จะได้ถั่วเน่า
6. บดถั่วเน่าที่ทำการหมัก เติมเกลือ หรืออาจเติมสารที่ทำให้รสชาติดี เช่น ขิง พริกแดง แล้วห่อด้วยใบตอง นำไปนึ่งหรือย่างก่อนรับประทาน วิธีนี้สามารถเก็บรักษาถั่วเน่าไว้ได้นาน 2 วัน หรือนำถั่วเน่ามาจัดเป็นแผ่นวงกลม ผึ่งแดดให้แห้งจะเก็บไว้ได้นาน เรียกเป็นภาษาเหนือว่า "ถั่วเน่าแคป" โดยมีวิธีการทำดังนี้

6.1 นำถั่วเน่าที่ได้มาทำเป็นแผ่นบางๆลักษณะกลม หลังจากบดจนละเอียดแล้ว ใช้ใบตอง "หุก" โดยใบหนึ่งวางแบนอยู่บนฝ่ามือซ้าย อีกใบหนึ่งอยู่บนมือขวาใช้ขยำถั่วเหลืองที่บดละเอียดวางลงใบที่อยู่มือซ้าย จากนั้นจึงใช้ทั้ง 2 ใบที่มือทั้ง 2 ข้างมาประกอบกันจนถั่วเหลืองแบนราบลง มีลักษณะคล้ายมะม่วงกวน

6.2 นำไปตากแดด 1 วัน

ปริมาณกรดอะมิโนและคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลืองหมักหรือถั่วเน่าของภาคเหนือของไทยตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมักจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ดังตาราง 1 และตาราง 2

ตาราง 1 ส่วนประกอบของกรดอะมิโนของถั่วหมัก (หน่วยเป็นกรัม ต่อ 100 กรัมถั่วหมัก)

ชนิดของกรดอะมิโน	ถั่วที่ล้างและคัดเปลือกออก	ถั่วที่ต้มแล้ว	2 วันหลังการหมัก	ถั่วเน่า
Lysine	4.8	12.1	5.7	6.7
Histidine	2.8	5.6	2.5	3.1
Arginine	8.0	6.6	7.5	6.4
Asparagine	12.5	10.7	12.5	11.0
Threonine	4.7	3.6	4.3	4.1
Serine	3.9	4.3	3.5	3.9
Glutamic acid	18.7	15.8	19.9	18.8
Proline	6.3	4.7	3.8	3.8
Glycine	4.0	4.1	4.0	4.4
Alanine	4.1	4.5	4.2	4.2
Valine	6.0	5.2	5.8	6.1
Methionine	1.8	2.3	2.5	2.4
Isoleucine	5.0	4.6	5.1	5.3
Leucine	8.1	6.8	8.0	8.5
Tyrocine	3.8	3.9	4.2	4.6
Phynylalanine	5.7	5.3	6.4	6.4

ที่มา: Marie-Paule, 1985

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตาราง 2 คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเน่า (คำนวณได้จากอาหารส่วนที่กินได้ 100 กรัม)

สารอาหาร (nutrient)	ถั่วเน่าเปียก Fermented Soy Bean (wet)	ถั่วเน่าแห้ง Fermented Soy Bean (dried)
Cal. Unit	152.0	388.0
Moisture %	61.8	12.0
Protein (gm)	17.9	43.9
Fat (gm)	6.6	17.6
CHO (gm)	5.3	13.5
Fibre (gm)	3.8	8.4
Ash (gm)	4.6	4.6
Ca (gm)	198.0	292.0
P (gm)	223.0	5.0
Fe (gm)	6.1	21.0
Vitamins		
- A I.U.	328.00	283.00
- B_1 (mg)	0.04	0.06
- B_2 (mg)	0.45	0.73
- Niacin (mg)	1.60	1.50
- C (mg)	0.00	0.00

ที่มา : กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข , 2527

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักอื่นๆที่มีลักษณะคล้ายถั่วเน่า

นัตโต (Natto) คือผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักของญี่ปุ่น ซึ่งแบ่งเป็นสามชนิดได้แก่ ฮิโตฮิกินัตโต ยูกิวารินัตโต และฮามานัตโต นัตโตที่มีการผลิตและเป็นที่นิยมมากที่สุดได้แก่ ฮิโตฮิกินัตโต ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมักได้แก่ *Bacillus natto* (สายพันธุ์หนึ่งของ *Bacillus subtilis*) การผลิตเริ่มโดยแช่ถั่วให้อุ้มน้ำ นึ่งหรือต้มให้สุก เมื่อถั่วเย็นลงถึงประมาณ 45 องศาเซลเซียส ใส่กล้า *Bacillus natto* ซึ่งอยู่ในรูปสปอร์ แบ่งบรรจุภาชนะเช่นกล่องหรือถุงพลาสติกขนาดประมาณ 50-100 กรัม เนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อนี้อยู่ระหว่าง 40-42 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงต้องบ่มไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าวประมาณ 18-20 ชั่วโมง แบคทีเรียจะเจริญสร้างเมือกเหนียว ซึ่งเป็นสารพวกพอลิเปปไทด์ของกรดกลูตามิกและพอลิเมอร์ของฟรุกโตส (fructan) ทำให้เมล็ดถั่วปกคลุมไปด้วยเมือกเหนียวเหล่านี้ ชาวญี่ปุ่นบริโภคนัตโตกับข้าวหรือนำไปปรุงกับอาหารชนิดอื่น

การหมักนัตโตได้เริ่มเปลี่ยนจากการใช้เชื้อจากธรรมชาติมาใช้กล้าเชื้อเมื่อ ค.ศ. 1920 โดยมีการคัดเลือก *Bacillus natto* สายพันธุ์ที่ผลิตเมือกได้ดี นอกจากนี้ในปัจจุบันยังได้มีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้เชื้อสามารถผลิตไวตามิน B_{12} เพื่อเพิ่มไวตามินนี้ในการผลิตด้วย เนื่องจาก *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆได้ดีมาก ดังนั้นกล้าที่ผลิตจึงอยู่ในรูปของสปอร์ ซึ่งในประเทศญี่ปุ่นมีการผลิตนัตโตเป็นการค้าโดยมีทั้งรูปแบบที่เป็นของเหลวและผงไลโอฟิไลส์บรรจุซองหรือขวดจำหน่ายในท้องตลาด ส่วนการหมักในระดับอุตสาหกรรมนั้นจะใช้กล้าปริมาณน้อยมาก คือประมาณ 10^7-10^8 สปอร์ต่อถั่วเหลืองสุก 10 กิโลกรัม (นภา, 2534)

รสชาติที่เป็นเอกลักษณ์ของนัตโตจะขึ้นกับปริมาณ diacyl คือ tetramethyl pyrazine และสารประกอบซัลเฟอร์ ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ซึ่งทำให้เกิดสีและรสของถั่วหมัก (ภาณุวรรณ, 2538)

ประโยชน์ของนัตโต (Shiroki, 1999)

1. ป้องกันโรคหัวใจ เนื่องจากในนัตโตมีเอนไซม์ pyrazine เป็นตัวป้องกันไม่ให้เลือดจับตัวกันเป็นก้อน นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ nattokinase ซึ่งพบในส่วนที่เหนียวของนัตโต โดยเอนไซม์ nattokinase จะเป็นตัวช่วยละลายเลือดที่จับตัวกันเป็นก้อน ซึ่งเลือดที่จับตัวกันเป็นก้อนนี้จะไปกีดขวางการไหลเวียนของเลือด ซึ่งนำไปสู่การเป็นโรคหัวใจ

2. ป้องกันโรคกระดูกพรุน กระดูกสร้างขึ้นจากโปรตีนชนิดพิเศษที่เรียกว่า gamma glutamic acid ร่วมกับแคลเซียม ซึ่งเราสามารถพบ gamma glutamic acid ในส่วนที่เหนียวของนัตโต โดยสารนี้จะเป็นตัวช่วยในการดูดซึมแคลเซียมจากลำไส้ รวมทั้งยังพบว่าในนัตโตยังมีวิตามิน K_2 ในปริมาณมากซึ่งจะเป็นตัวช่วยในการเสริมสร้างกระดูก

3. มีผลในการเป็นสาร antibiotic โดยพบว่า *Bacillus natto* สามารถผลิตสาร antibiotic พวก bacitracin polymyxin และ urothin ซึ่งสามารถกำจัดเชื้อ *Salmonella, 0-157 E.coli* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหารได้

4. ชลอความแก่ เนื่องจากในนัตโตมีปริมาณ vitamin E และสาร lecithin ซึ่งช่วยให้ไขมันและน้ำในผิวหนังเกิดความสมดุล

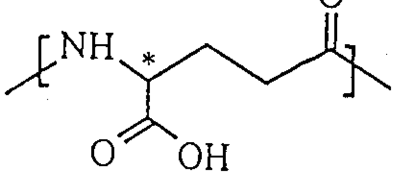
5. ป้องกันโรคมะเร็งในลำไส้

คีนีมา (kinema) เป็นอาหารพื้นเมืองที่ทำจากถั่วเหลืองหมักของชาวเนปาลและอินเดียนิยมบริโภคทางด้านตะวันตกของเบงกอลและในรัฐสิขิมของประเทศอินเดีย วิธีการทำคีนีมา คือ นำถั่วเหลืองมาล้างทำความสะอาด แช่น้ำเอาไว้หนึ่งคืน จากนั้นนำมาต้มประมาณ 90 นาที นำมาบดแล้วห่อด้วยใบตอง ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการหมักประมาณ 1-3 วันในที่มีอุณหภูมิอบอุ่นประมาณ 25-35 องศาเซลเซียส หลังจากผ่านไป 12 ชั่วโมงจะเห็นบริเวณผิวจะเป็นเมือก วิธีการรับประทานจะต้องนำไปทอดหรือใส่ในแกงเพื่อเพิ่มรสชาติ

นอกจากนี้ยังมีอาหารที่ทำจากถั่วเหลืองหมักที่มีลักษณะคล้ายถั่วเน่า คือ schuidouchi ในประเทศจีน dawadawa และ iru ในอัฟริกาตะวันตก เป็นต้น

กรดแกมมาพอลิกลูตามิก (γ-Polyglutamic acid)

γ-Polyglutamic acid (PGA) เป็นสารพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ที่ผลิตโดย *Bacillus sp.* (Thorne and Leonard, 1958) และขับสารนี้ออกมานอกเซลล์ซึ่งมีลักษณะข้นและหนืด (Tanaka *et al.*, 1993) โครงสร้างของ PGA เป็นโฮโมพอลิเมอร์ของ glutamic acid ที่มี amide เป็นตัวเชื่อมระหว่าง glutamate γ-carboxyl และα-amino group ประกอบด้วย D-glutamic acid และ L-glutamic acid ดังภาพ 1



ภาพ1 โครงสร้าง γ-polyglutamic acid (Ko and Gross, 1998)

พื้นฐานสำคัญที่เป็นแรงกระตุ้นให้มีการผลิตสารพอลิเมอร์ชนิดนี้ คือ สามารถย่อยสลายได้โดยชีววิธี (biodegradable) ละลายน้ำได้ เป็น anionic และสามารถรับประทานได้ จึงเป็นที่น่าสนใจเพื่อใช้พัฒนาในอุตสาหกรรมยา อาหาร และเครื่องสำอาง (Ko and Gross, 1998)

ในปี 1997 Ivanovics และคณะได้พบว่า PGA เป็นองค์ประกอบของแคปซูลใน *Bacillus anthracis* และในปี 1942 Bovarnick ได้แสดงว่า *Bacillus subtilis* ได้ปล่อย PGA ออกมาในอาหารหมัก

ในการผลิต PGA ของแบคทีเรีย มีความต้องการอาหารในการผลิตที่แตกต่างกัน หลายชนิดต้องการ L-glutamic acid ในการผลิต แต่บางชนิด เช่น *B.subtilis* var. *polyglutamicum* ซึ่งไม่ต้องการ L-glutamic acid (Goto and Kunioka, 1992)

มี *Bacillus* หลายชนิดที่สามารถผลิต PGA ได้ เช่น *Bacillus subtilis*, *B. lichenifomis*, *B. megaterium* และ *B. anthracis* แต่มีสายพันธุ์พบเสมอว่าสามารถผลิต PGA ได้มากคือ *B. subtilis* (natto) เพราะว่าในการทำ natto ได้ใช้ *B. subtilis* (natto) นี้เป็นกล้าเชื้อในการผลิต ปริมาณ PGA ใน natto ที่ผลิตโดยเชื้อทำให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ดีขึ้น (Nagai and Itoh, 1998) การผลิต PGA ของ *B.licheniformis* มีลักษณะการสังเคราะห์คล้ายกับ *B. subtilis* โดยสังเคราะห์จาก L-glutamic acid ผ่านปฏิกิริยาแคตาโบไลท์หลายขั้นตอนโดยใช้เอนไซม์หลายชนิดบริเวณ cytoplasmic membrane (Troy, 1973)

การผลิตกรดกลูตามิก

ในปี 1957 Kinoshita และคณะ (อ้างโดยกำเนิด, 2531) พบแบคทีเรียที่สามารถผลิต L-glutamate จากคาร์โบไฮเดรตได้มากกว่า 30 กรัมต่อลิตรและจัดจำแนกแบคทีเรียเหล่านั้นเป็น *Corynebacterium glutamicum* ปัจจัยสำคัญที่ทำให้แบคทีเรียผลิต L-glutamate ได้ปริมาณมาก คือต้องมีไบโอตินในอาหารเลี้ยงเชื้อและแบคทีเรียนั้นต้องไม่สามารถสร้างเอนไซม์ α-ketoglutarate dehydrogenase หรือมีเอนไซม์ที่ไม่สามารถทำงานได้เมื่อมีไบโอตินในปริมาณที่เป็น suboptimal ซึ่งทำให้มีการเจริญมากที่สุดและมีการผลิต L-glutamic ได้ดี แต่ในสภาวะที่มีไบโอตินในปริมาณมากเกินไป จะผลิต L-glutamate ได้น้อยแต่มีการสร้างสารประกอบอื่นแทน คือ lactate และ succinate

ผลของไบโอตินต่อกระบวนการ glycolysis ในกระบวนการนี้จะเป็นสมดุลระหว่าง EMP pathway และ HMP shunt ซึ่งขึ้นกับปริมาณไบโอตินในอาหาร ภายใต้สภาวะที่ขาดไบโอติน HMP shunt จะมีกิจกรรมดีจึงผลิตกลูตามิกได้ดี ผลของไบโอตินต่อการออกซิไดซ์กรดอินทรีย์ ถ้ามีไบโอตินมากจะเกิดออกซิไดซ์กรดอินทรีย์ได้มากกว่าในที่มีไบโอตินน้อย ทำให้เกิดน้ำตาลมากและ

ถูกใช้ แบบเสียเปล่าด้วย ทำให้การผลิตกรดกลูตามิกลดลง ต่อมาพบว่าในกรณีที่มีไบโอตินมากเกิน ถ้าเติมเพนนิซิลินลงไปในช่วงที่เชื้อมีการเจริญเชื้อจะสร้างกลูตามิกได้ดี ยาปฏิชีวนะอื่นที่ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ เช่น cephalosporin c ก็ใช้แทนเพนนิซิลินได้ การเติมกรดไขมันอิ่มตัวที่มีคาร์บอน 16-18 อะตอม หรือเอสเตอร์ของมัน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น hydrophillic polyalcohol พบว่าเชื้อจะสร้างกรด กลูตามิกได้ดีเหมือนเดิมในอาหารที่มีไบโอตินมาก และต่อมาพบว่ากรดโอเลอิกก็ใช้แทนไบโอตินได้ การค้นพบว่าเพนนิซิลินและกรดไขมันอิ่มตัวแก้ปัญหาการมีไบโอตินมากเกินไปทำให้การผลิตกรดกลูตามิกในระดับอุตสาหกรรมสามารถใช้วัตถุดิบ คือ โมลาสได้โดยการเติมสารดังกล่าวระหว่างที่เชื้อมีการเจริญ เพราะโมลาสจากอ้อยมีไบโอตินมากเกินไป

การปล่อยกรดกลูตามิกออกมาจะสัมพันธ์โดยตรงกับการส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ในกรณีที่มีไบโอตินมาก การสร้างกลูตามิกยังคงมีอยู่ แต่การส่งผ่านคือปล่อยออกจากเซลล์จะต่ำ เป็นที่แน่ชัดว่าถ้าเซลล์มีไบโอตินมากกว่า 0.5 mg/ml ของเซลล์ จะมีการสังเคราะห์กรดโอเลอิกได้มากพอ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีฟอสโฟลิปิดสูง เซลล์จึงเปลี่ยนกรดกลูตามิกได้น้อย และถ้าให้น้อยกว่า0.5 ng/mg ของเซลล์ การสังเคราะห์ฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์จะน้อย จึงมีการปล่อยกรดกลูตามิกออกมา จากผลอันนี้ยืนยันว่า acetyl-CoA carboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีไบโอตินเป็นโคเอนไซม์ เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดโอเลอิกและกรดไขมันอื่นๆ และกรดไขมันที่มีคาร์บอน 16-18 อะตอม จะยับยั้งการสร้างกรดโอเลอิก โดยการกด acetyl-CoA carboxylase และจากการศึกษาต่อมาพบว่าเพนนิซิลินเป็น secondary effect ต่อหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ขณะที่ primary effect คือยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ไม่มีสิ่งปกป้อง ขณะที่กรดไขมันอิ่มตัวจะทำให้การสร้างฟอสโฟลิปิดน้อยลง โดยพบว่าเซลล์ที่เจริญในอาหารที่มีเพนนิซิลินหรือกรดไขมันอิ่มตัวที่มีคาร์บอน 16-18 อะตอม จะมีการปล่อยกรดที่สร้างออกมาสูง พบว่าเพนนิซิลินยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ทำให้เซลล์ยาวออกหรือบวม แต่กรดไขมันอิ่มตัวไม่มีผลต่อโครงสร้างของเซลล์ ได้เปรียบเทียบผลของสารทั้งสองในเรื่องแรงดันออสโมซิสของอาหารโดยเติม polyoxyethylene monopatmitate พบว่ามีการปล่อยกรดกลูตามิกออกมามากในอาหารที่มีไบโอตินสูงโดยไม่ขึ้นกับแรงดันออสโมซิส แต่เพนนิซิลินจะทำให้เซลล์ปล่อยกลูตามิกออกมาได้มากเฉพาะในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสต่ำ โดยในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูงจะไม่ได้ผล อาจกล่าวสรุปได้ว่าการขาดฟอสโฟลิปิดทำให้เซลล์ปล่อยกรดกลูตามิกออกนอกเซลล์ได้ตลอดเวลา จึงไม่เกิดการควบคุมแบบ feedback นั่นเอง (ดวงพร, 2530)

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ได้คือ ammonium sulfate, ammonium chloride, ammonium phosphate, aqueous ammonia, ammonia gas และ urea ในอุตสาหกรรมการผลิต L-glutamate จะใช้ aqueous ammonia หรือ ammonia gas แม้ว่าจะต้องการแอมโมเนียมไอออนในปริมาณมาก แต่

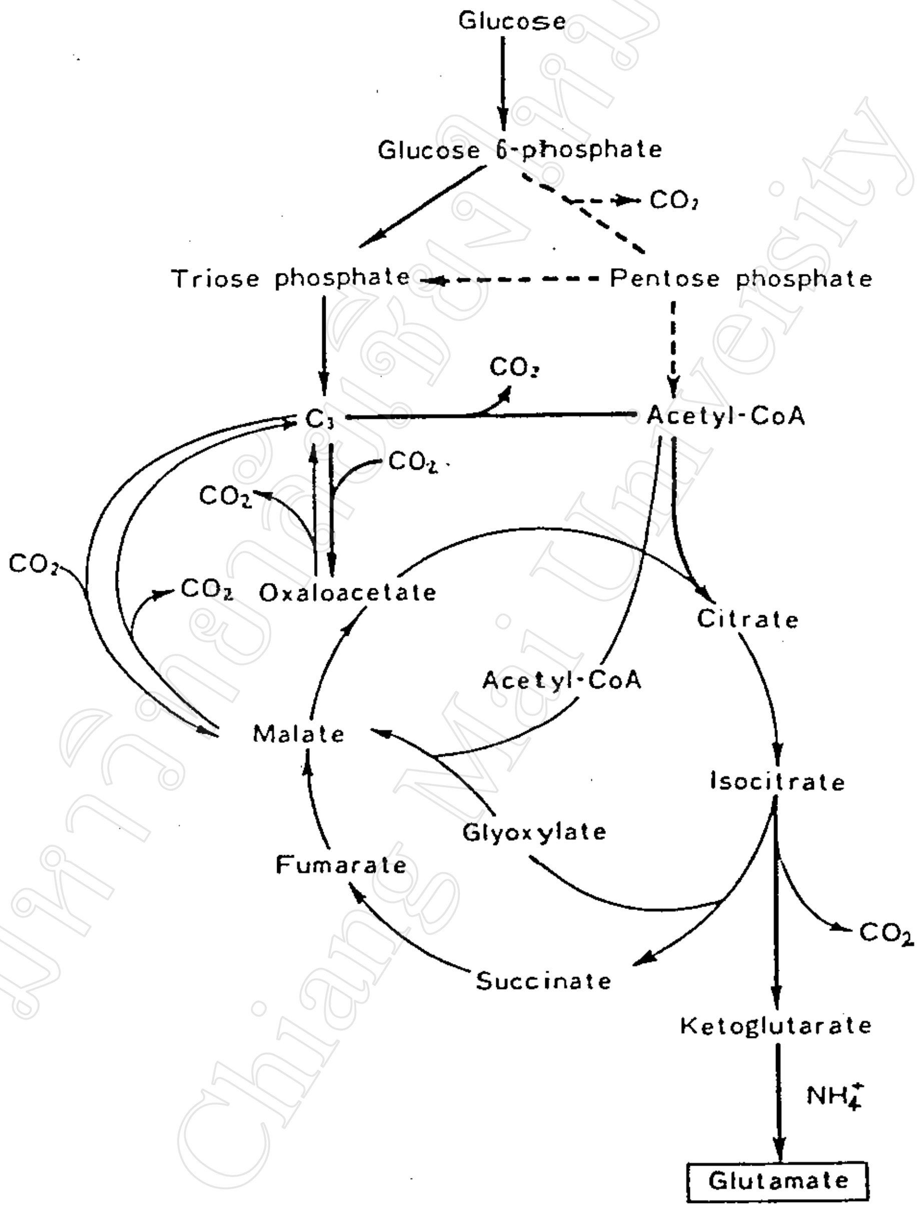
แอมโมเนียมไอออน ที่มีความเข้มสูงจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีเท่าๆกับการผลิตกรดกลูตามิก ดังนั้นจึงต้องใช้แอมโมเนียมไอออนในปริมาณที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักได้เท่านั้น

วิถีการสังเคราะห์กรดกลูตามิกจากกลูโคส

ภาพ 2 แสดงวิถี (pathway) การสังเคราะห์กลูตาเมตจากกลูโคส เส้นหนาแสดงวิถีหลัก ซึ่งจะมีการใช้เอนไซม์อย่างน้อยที่สุด 16 ขั้นตอน ในขั้นตอนสุดท้าย α-ketoglutarate จะเปลี่ยนเป็นกลูตาเมต โดยปฏิกิริยา reductive amination อาศัยเอนไซม์ NADP-specific glutamate dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์กลูตาเมต เมื่อนำเซลล์ในระยะพักตัวไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส และไม่มีแอมโมเนียจะมีการสะสมของ α-ketoglutarate มากกว่ากลูตาเมต ในการทำงานของ glutamate dehydrogenase จะได้ NADPH มาก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยา isocitrate dehydrogenase reaction และ glutamate dehydrogenase จะให้ NADP เพื่อใช้ในการทำงานของเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase

นอกจาก EMP pathway แล้วแบคทีเรียที่สร้างกรดกลูตามิกจะใช้ HMR pathway ในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 2 และ 3 ตัว (ภาพ 2 เส้นประ) จากนั้นสารประกอบนี้จะเข้าสู่ TCA cycle

เมื่อทำการหมักกลูตาเมตโดยใช้ $^{14}CO_2$ จะตรวจพบ ^{14}C ในหมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ของกลูตาเมต และพบว่ามีเอนไซม์ 2 ชนิดที่ช่วยในการตรึง CO_2 คือ oxalaxetate carboxylase และ NADP-linked malic enzyme ซึ่งจะทำให้มีการตรึง CO_2 เข้าไปใน pyruvate เพื่อสร้าง malate จากนั้น malate จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็น oxaloacetate โดยเอนไซม์ malate dehydrogenase แล้ว oxaloacetate จะเปลี่ยนเป็น citrate แบคทีเรียที่สร้างกรดกลูตาเมตจะใช้ glyoxylate pathway (ภาพ 2 เส้นบาง) ในกรณีที่มีความผิดปกติของ TCA cycle นั่นคือ isocitrate จะเกิดปฏิกิริยาได้ 2 ทาง ในระยะ growth phase จะเกิดปฏิกิริยาของ isocitritase เพื่อสร้างพลังงานและ intermediates สำหรับกระบวนการสังเคราะห์ แต่หลังจากระยะ growth phase การผลิตกรด กลูตาเมตจะเกิดได้ดีกว่าและไม่มีปฏิกิริยาของ isocitritase เกิดขึ้น



ภาพ 2 วิถีการสังเคราะห์กรดกลูตามิกจากกลูโคส (กำนิด, 2531)

การหาปริมาณ γ-polyglutamic acid

1. การวิเคราะห์โดยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometric assays)

สเปคโตรโฟโตมิเตอร์วัดปริมาณแสงที่ดูดไว้ที่ความถี่ใดความถี่หนึ่ง หรือวัดปริมาณแสงอุลตร้าไวโอเลทที่ถูกสารดูดเอาไว้ในความถี่ช่วงอุลตราไวโอเลท หรือวัดความเข้มข้นของแสงเรือง (Fluorescence) ที่เกิดขึ้นเมื่อสารถูกกับแสงอุลตราไวโอเลท สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ คัลลอริมิเตอร์ (Colorimeter) ใช้วัดคลื่นแสงในช่วงที่ตามองเห็นได้เป็นสีต่างๆคือ ในช่วง 350-1000 μm เครื่องมือจะวัดปริมาณแสงที่ถูกสารมีสีดูดซึมไว้ที่แสงความถี่ช่วงหนึ่งๆ สีแต่ละสีจะดูดซึมแสงที่ความถี่แสงช่วงสั้นๆ ผลผลิตจากการหมักซึ่งเป็นสารมีสีและแตกต่างไปจากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถใช้คัลลอริมิเตอร์หาปริมาณได้โดยตรงหรือผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีง่ายๆ เช่นกรองตะกอนออกเสียก่อน ในกรณีที่ผลผลิตจากการหมักเป็นสารไม่มีสีก็ยังใช้คัลลอริมิเตอร์หาปริมาณได้ โดยหาสารเคมีมาทำปฏิกิริยากับผลผลิตนั้นให้เกิดเป็นสีขึ้น

ความถี่แสงที่จะใช้ในการวัด จะใช้ความถี่ที่สารละลายดูดซึมแสงได้มากที่สุด จากปริมาณแสงที่ดูดซึมโดยสารละลายที่มีสีเราสามารถรู้ปริมาณสารได้ โดยอ่านค่าจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแสงกับแสงที่ดูดซึม (กำเนิด, 2531)

2. การวิเคราะห์โดยอิเลคโทรโฟรีซีสแบบ โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต-พอลิอะคลิลาไมด์ (SDS-PAGE)

ในปัจจุบันการทำ PAGE มักนิยมใช้สารซักฟอกที่มีชื่อว่าโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต หรือ SDS ในระบบบัฟเฟอร์ร่วมกับสารที่สลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) การทำ PAGE ที่มี SDS เรียกว่า SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกหน่วยย่อยของโปรตีนและหามวลโมเลกุล SDS เป็นสารซักฟอกแอนไอออนิกที่มีประจุลบสามารถจับกับสายโซ่เปปไทด์ด้วยอัตราส่วนคงที่คือ SDS 1.4 กรัม/สายพอลิเปปไทด์ 1 กรัม SDS-พอลิเปปไทด์คอมเพลกซ์นี้มีรูปร่างเป็นแท่งเนื่องจากสายพอลิเปปไทด์นี้เมื่อถูกจับด้วย SDS จะคลายการขดม้วนออกเป็นสายยาว ซึ่งคงที่ในขณะที่ความยาวของคอมเพลกซ์จะเป็นสัดส่วนกับมวลโมเลกุลของสายพอลิเปปไทด์ คอมเพลกซ์นี้มีประจุลบ มีอัตราส่วนของประจุลบต่อมวลหรือมีความหนาแน่นของประจุที่เท่ากัน และมีรูปร่างเหมือนกัน จึงทำให้การเคลื่อนที่ของสายโซ่พอลิเปปไทด์ขึ้นกับมวลโมเลกุลของสายโซ่พอลิเปปไทด์และทุกคอมเพลกซ์จะเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกันคือเข้าหาขั้วบวก เมื่อเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล จะทำให้ทราบถึงมวลโมเลกุลของสายโซ่พอลิเปปไทด์ และจากการย้อมสีทำให้ทราบถึงจำนวนหน่วยย่อยหรือจำนวนสายโซ่พอลิเปปไทด์ใน "native protein"

SDS-PAGE เป็นที่เทคนิคที่ง่ายและเร็ว ใช้ปริมาณโปรตีนที่ต้องการศึกษาน้อยเป็น μg มีประโยชน์ในการศึกษาพวกเอนไซม์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายหน่วย โปรตีนที่ถูกแยกโดย

SDS-PAGE สามารถนำไปศึกษาคุณสมบัติอื่นๆต่อไปได้ โดยการชะแต่ละแถบที่แยกออกจากกันจากเจลแล้วกำจัด SDS หรือสารเคมีอื่นๆจากนั้นจึงนำไปศึกษา เช่น วิเคราะห์กรดอะมิโน แผนที่เปปไทด์ หาปลาย N- หรือปลาย C- เป็นต้น

3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ในการแยกกรดอินทรีย์ใช้ Ion exchange HPLC ในการแยก mono- di- และ tricarboxylic acid ออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ ถ้าใช้ microparticulate silica ซึ่งมี anion exchanger อยู่ที่ผิวซึ่งเชื่อมด้วยพันธะเคมีเป็น packing ทำให้เราสามารถแยกกรดอินทรีย์ที่มีความสำคัญทางชีวภาพได้ เช่น กรดที่เกี่ยวข้องกับ Kreb's cycle

การวิเคราะห์กรดอินทรีย์ผสมควรใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วย MicroPak AX-10 ซึ่งเป็น weak anion exchange column อาจใช้คอลัมน์ประเภทนี้ร่วมกับ gradient elution เพื่อแยกกรดอินทรีย์ผสมในสารชีวภาพ (สายสุนีย์ , 2525)

การแบ่งจุลินทรีย์ตามช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตแตกต่างกันจึงสามารถแบ่งจุลินทรีย์ออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

ก. ไซโครไฟล์ (Psychrophile) เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่ 0 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 15 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า พวกนี้จัดเป็นไซโครไฟล์ที่แท้จริง (obligate psychrophile) อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญ คือ 30 องศาเซลเซียส แต่บางพวกมีช่วงอุณหภูมิเหมาะสมระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดในการเจริญ คือ 35 องศาเซลเซียส จึงจัดเป็น facultative psychrophile หรือ psychrotroph ตัวอย่าง เช่น *Pseudomonas*, *Micrococcus* เป็นต้น

ข. มีโซไฟล์ (Mesophile) เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลางระหว่าง 25-40 องศาเซลเซียส โดยมีอุณหภูมิต่ำสุดที่จะเจริญได้ที่ 5-25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเหมาะสมที่ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้ที่ 43 องศาเซลเซียส ตัวอย่าง เช่น *Neisseria*, *Salmonella*, *Vibrio* เป็นต้น

ค. เทอร์โมไฟล์ (Thermophile) เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงระหว่าง 45-60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเหมาะสมอยู่ระหว่าง 50-55 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 60-85 องศาเซลเซียส ตัวอย่าง เช่น *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoactinomyces* เทอร์โมไฟล์บางพวกเจริญมาในช่วงของมีโซไฟล์ จึงเรียกว่า facultative thermophile หรือ ยูริเทอร์โมไฟล์ (eurithermophile) บางพวกเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส เรียกว่าเทอร์โมไฟล์แท้จริง (stenothermophile) (นงลักษณ์และปรีชา, 2539)

นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียหลายชนิดสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้ซึ่งเรียกจุลินทรีย์พวกนี้ว่า "Thermotolerant" หรือพวก "Thermoduric" ซึ่งบางพวกก็อาจไม่สร้างสปอร์ ซึ่งพวก thermotolerant ส่วนใหญ่มักจะสร้าง endospore ซึ่ง endospore สามารถมีชีวิตอยู่ในอุณหภูมิที่ vegetative cell เกือบจะตายในทันที ตัวอย่าง เช่น endospore ของ *Bacillus* สามารถทนความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสได้เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือมากกว่า ถึงแม้ว่าจะสปอร์ถูกฆ่าที่อุณหภูมินี้บ้างแต่อัตราการตายจะช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ vegetative cell เนื่องจาก endospore มีปริมาณน้ำน้อยกว่าใน vegetative cell จึงช่วยให้ทนความร้อนได้ดีกว่า และยังพบว่าโปรตีนจะทนต่อการสลายในที่แห้งได้มากกว่าอยู่ในรูปของสารละลาย ซึ่งโปรตีนในสปอร์มักจะอยู่ในรูปที่ไม่ละลายและมักจะอยู่รวมกับองค์ประกอบอื่นๆ เช่น lipids เป็นต้น (Stanier *et al.*, 1957)

Thermotolerant bacteria ส่วนใหญ่สามารถมีชีวิตรอดและสามารถเพิ่มจำนวนในช่วงอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียสได้ และยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิห้องหรือต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียสได้ (Cowen, 1968)

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียใน Genus *Bacillus* (สุรางค์ และคณะ, 2538)

Bacillus เป็น genus หนึ่งของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้ สปอร์ของแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีรูปร่างหลายแบบแตกต่างกัน เช่น กลม รูปไข่ ทรงกระบอก หรือบางครั้งอาจมีรูปร่างคล้ายไต หรือผลกล้วยอยู่ในเซลล์ของแบคทีเรีย เราจึงเรียกสปอร์นี้ว่า endospore

สปอร์ของ *Bacillus* พบครั้งแรกโดย Cohn ในปี 1872 ใน *Bacillus subtilis* ซึ่งในขณะนั้นมีชื่อเรียกว่า *Vibrio subtilis* ในครั้งนี้ Cohn ได้พบว่าสปอร์สามารถทนความร้อนได้มากกว่า vegetative cell ในสมัยนั้นๆถ้าพบแบคทีเรียที่สามารถสร้าง endospore และเจริญในสภาพที่มีอากาศมักคิดว่าเป็น *Bacillus* sp. และถ้าเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนก็จะเป็น *Clostridium* sp. จนกระทั่งค้นพบว่ามีแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆที่สามารถสร้างสปอร์ จึงได้มีการจัดจำแนกและแบ่งแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ออกเป็น 6 กลุ่มในปัจจุบัน ดังตาราง3

ตาราง 3 คุณสมบัติของแบคทีเรียที่สามารถสร้าง endospore (Slepecky, 1992)

Genus	G+C (mol%)	รูปร่าง	คุณสมบัติที่สำคัญ
Bacillus	33-36	Rods	Catalase positive ส่วนใหญ่เป็น strict aerobes
Sporolactobacillus	38-40	Rod	Homolactic ferment tation, Facultative anaerobe หรือ micro aerophilic
Clostridium	24-54	Rodsหรือ Filaments	strict anaerobe
Desulfotomaculum	37-50	Rodsหรือ Filaments	sulfate reduction และ strict anaerobe
Sporosarcina	40-42	Cocci ในรูป tetrads หรือ pockets	strict aerobe
Thermoactinomyces	52-54.8	Branched-filaments	strict aerobe

จะได้เห็นว่าคุณสมบัติหลักที่ใช้ในการแยก Genus *Bacillus* ออกจากแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ที่สร้าง endospore คือสามารถสร้างเอนไซม์ catalase และเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศเป็นส่วนใหญ่ และมีส่วนน้อยที่เป็นพวก facultative anaerobe Genus *Sporolactobacillus* เป็นแบคทีเรียรูปท่อน และสร้าง endospore เช่นเดียวกับ Genus *Bacillus* แต่แตกต่างจาก *Bacillus* group ในคุณสมบัติข้อที่ *Sporolactobacillus* สามารถเกิดขบวนการหมักย่อยแล้วได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดแลคติกอย่างเดียว ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้พบในกลุ่ม Lactic acid bacteria จึงจัดได้ว่า *Sporolactobacillus* ก็คือ Lactic acid bacteria ที่สร้างสปอร์นั่นเอง %G+C content ของแบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 38-40 ซึ่งแคบกว่าของ *Bacillus* ซึ่งอยู่ระหว่าง 33-36 คุณสมบัติอีกข้อหนึ่งที่ทำให้ *Sporolactobacillus* แยกจาก *Bacillus* ได้ชัดเจนก็คือ *Sporolactobacillus* ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ catalase ได้

Genus *Clostridium* และ *Desulfotomaculum* แตกต่างจาก *Bacillus* อย่างชัดเจนในคุณสมบัติข้อที่แบคทีเรีย 2 กลุ่มนี้เป็น anaerobic bacteria แบคทีเรียในตาราง 3 ที่สามารถสร้าง สปอร์เป็น aerobic และสามารถสร้างเอนไซม์ catalase ได้เช่นเดียวกับ *Bacillus* แต่มีรูปร่างแตกต่างกันคือ

แบคทีเรียใน Genus *Sporosarcina* ซึ่งมีรูปร่างเป็น coccus และ *Thermoactinomycetes* ที่มีรูปร่างเป็นเส้นสายและมีกิ่งก้าน

วิธีการแยกและเลี้ยง *Bacillus*

วิธีที่ง่ายที่สุดก็คือ นำตัวอย่าง ดิน น้ำ อาหาร หรืออื่นๆที่ต้องการแยกสปอร์ของ *Bacillus* มาละลายน้ำและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน10-20 นาที หรือ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีโดยวิธีนี้จะสามารถทำลายแบคทีเรียพวกที่ไม่มีสปอร์และ vegetative cell ได้ เพราะฉะนั้นจะเหลือเฉพาะแบคทีเรียที่สร้างสปอร์อยู่ข้างใน หรือสปอร์อิสระที่สามารถทนต่อความร้อนในระดับนี้ได้ แล้วนำสารละลายดังกล่าวมา streak บน nutrient agar และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 วันก็จะพบโคโลนีของ *Bacillus* เจริญ

แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ส่วนใหญ่สามารถเจริญบน nutrient agar มีเพียงส่วนน้อยที่ต้องการแร่ธาตุพิเศษ นอกจากนี้เรายังสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ได้โดยการเติม $MnSO_4.H_2O$ ในปริมาณ 50 mg/l ใน nutrient agar ในบางครั้งเชื้อแบคทีเรียบางเชื้ออาจไม่จำเป็นต้องกระตุ้นโดยการเติมสารนี้ก็สามารถสร้างสปอร์ได้ในตอนแรก แต่เมื่อเลี้ยงและถ่ายเชื้อไปหลายๆครั้งเชื้ออาจจะไม่สร้างสปอร์ เราสามารถกระตุ้นการสร้างสปอร์โดยวิธีนี้ได้เช่นเดียวกัน

การตรวจว่าเชื้อสร้างสปอร์หรือไม่สามารถทำได้โดยการย้อม endospore โดยวิธี Schaffer-Fulton โดยวิธีนี้สปอร์จะติดสีเขียวของ malachite green ขณะที่ตัวเซลล์จะติดสีแดงของ safranin O หรือสังเกตจากวิธีการย้อมสีแกรมก็ได้เนื่องจากส่วนของสปอร์จะไม่ติดสี

อีกวิธีหนึ่งที่ง่ายและสะดวกก็คือ agar slide method ซึ่งทำได้โดยนำสารละลายของเชื้อแตะลงบนแผ่นสไลด์ที่ฉาบผิวบนด้วย water agar 1% ปิดด้วย cover glass แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast ส่วนของสปอร์อิสระหรือสปอร์ที่ติดอยู่ใน vegetative cell จะใสแสงผ่านได้ ตัดกับตัวเซลล์ที่มีสีเข้ม

การเก็บรักษาเชื้อ

เนื่องจาก *Bacillus* สามารถสร้างสปอร์ได้ ดังนั้นจึงสามารถเก็บรักษาเชื้อได้โดยวิธี streak เชื้อบน nutrient agar slant ในหลอดฝาเกลียว ทิ้งไว้ให้เจริญในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิห้อง 2-3 วันแล้วจึงนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บเชื้อได้นานกว่า 6 เดือน แต่ทั้งนี้ควรจะต้องตรวจสอบว่าเชื้อสามารถสร้างสปอร์หรือไม่บนอาหารชนิดนี้ ถ้าเชื้อไม่สร้างสปอร์ก็ควรกระตุ้นให้สร้างสปอร์ก่อนบน nutrient agar ผสม $MnSO_4.H_2O$ 50 mg/l แล้วจึงนำไปเก็บโดยวิธีเดียวกัน

การจัดจำแนกระดับ species

แบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ 3 กลุ่ม โดยสังเกตจากลักษณะรูปร่าง ตำแหน่งของสปอร์ การโป่งของเซลล์ที่มีสปอร์อยู่ภายในและลักษณะเฉพาะใน protoplasm ได้ดังนี้

Group I สปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ หรือทรงกระบอก ตำแหน่งสปอร์อยู่กลาง หรือค่อนไปทางปลายเซลล์ เซลล์ไม่โป่งออก (ภาพ 3) กลุ่มนี้ยังแยกออกเป็น

Group IA เซลล์มีขนาดใหญ่ กว้างมากกว่า 1µm ภายใน protoplasm จะมีแกรนูลที่ไม่ติดสีแกรม ทำให้เห็นเซลล์ไม่ติดสีเป็นช่วงๆ

Group IB ขนาดเซลล์กว้างน้อยกว่า 1 µm

Group II สปอร์ทำให้เซลล์โป่งออก สปอร์มีรูปร่างเป็นรูปไข่ ตำแหน่งอยู่กลางหรือปลายเซลล์ (ภาพ 4)

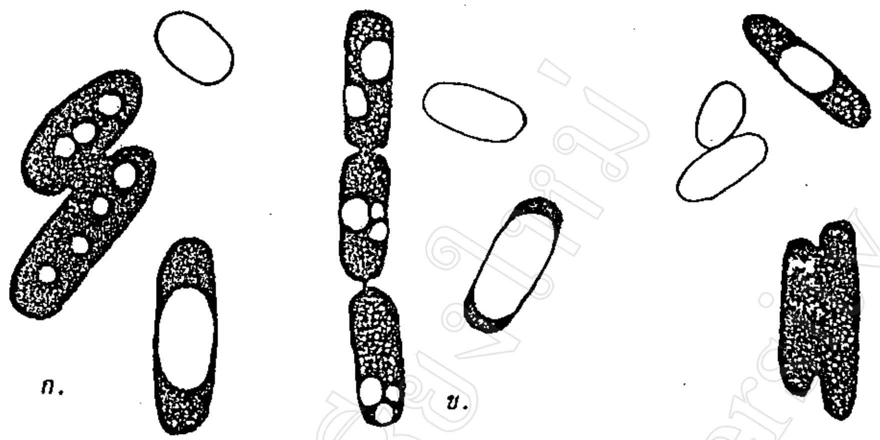
Group III สปอร์ทำให้เซลล์โป่งออก หรือบางครั้งไม่โป่ง สปอร์มีรูปร่างกลม ตำแหน่งอยู่ปลายหรือค่อนไปทางปลายเซลล์ (ภาพ 5)

โดยที่แบคทีเรียในแต่ละ group มีรายชื่อแสดงในตาราง 4 การจำแนกในระดับ species โดยคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาแบบง่ายๆในเบื้องต้นได้แสดงไว้ในภาพ 6

Group I	สปอร์รูปไข่, เซลล์ไม่โป่ง		
IA			
anthracis			
cereus			
megaterium			
mycoides			
thuringiensis			
IB			
amyloliquefaciens	*lentus*		
badius	*licheniformis*		
fastidiosus	*pumilus*		
firmus	*subtilis*		
Group II	**สปอร์รูปไข่เซลล์โป่ง**		
alcalophilus	*circulans*	*lentimorbus*	*polymyxa*
alvei	*coagulans*	*macerans*	*popillae*
amylolyticus	*larvae*	*macquariensis*	*stearothermophilus*
azotoformans	*laterosporus*	*pabuli*	*ralidus*
brevis	*lantus*	*pantothenticus*	
Group III	**สปอร์กลม**		
globisporus	*psychrophilus*		
insolitus	*schlegelii*		
marinus	*sphaericus*		
pasteurii			

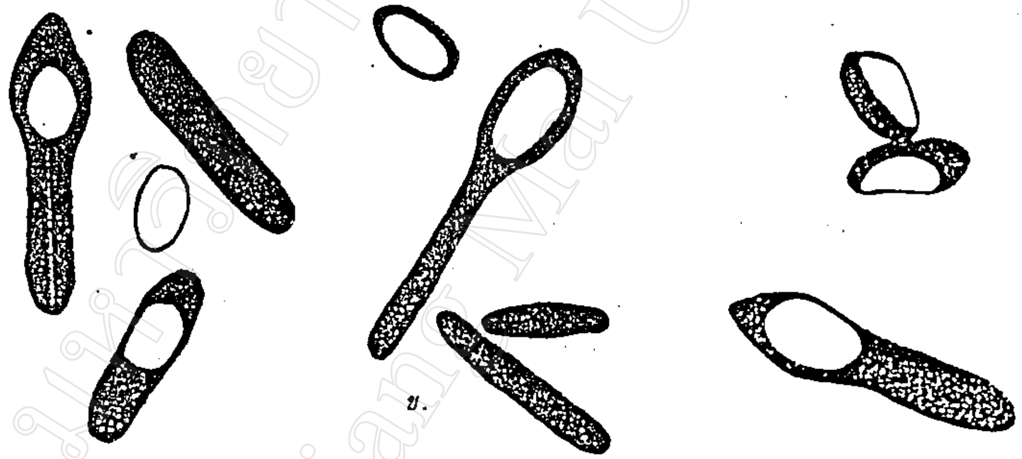
ตาราง 4 กลุ่มของ *Bacillus* species แบ่งตามสัณฐานวิทยา (Slepecky, 1992)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



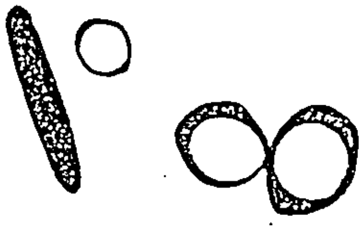
ภาพ 3 ลักษณะรูปร่างสปอร์ของ *Bacillus* species Group I

ก. *Bacillus megaterium* ข. *Bacillus cereus* ค. *Bacilus subtilis*



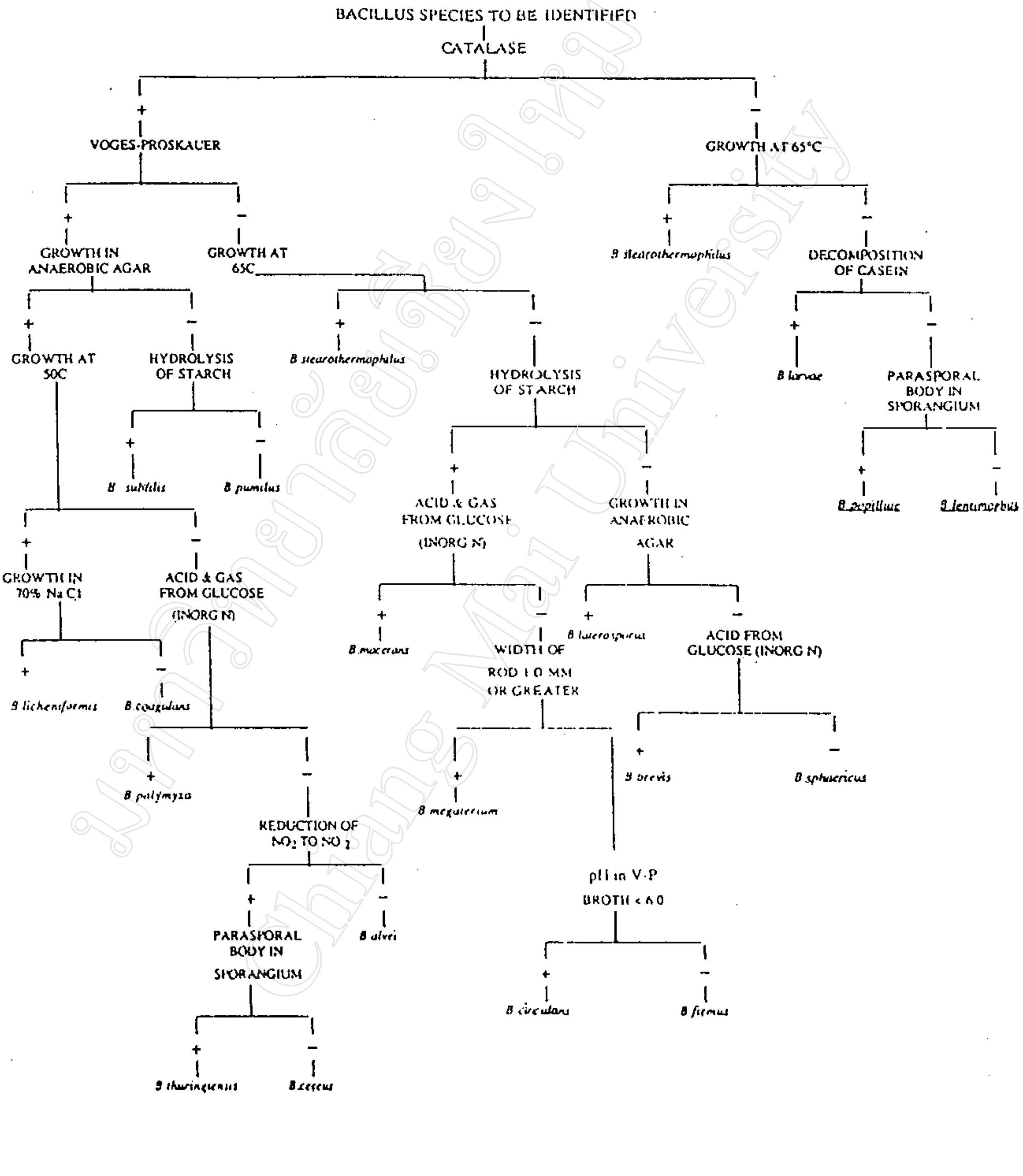
ภาพ 4 ลักษณะรูปร่างสปอร์และการโป่งของเซลล์ของ *Bacillus* species Group II

ก. *Bacillus coagulans* ข. *Bacillus circulans* ค. *Bacillus laterosporus*



ภาพ 5 ลักษณะรูปร่างของ *Bacillus* Species Group III *Bacillus sphaericus* (Slepecky, 1992)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



ภาพ 6 แผนภาพการจำแนก *Bacillus* species โดยคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาแบบง่ายในขั้นเบื้องต้น (Slepecky, 1992)

การศึกษาจุลินทรีย์ในถั่วเน่า

Sundhagul *et al.*, (1971) ได้ศึกษากระบวนการทำถั่วเน่าแบบพื้นเมืองของชาวบ้านทางภาคเหนือตอนบนและศึกษาลักษณะต่างๆของถั่วเน่า โดยพบว่าจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักเป็นแบคทีเรียกรัมบวก รูปแท่ง สามารถสร้างสปอร์ได้ ซึ่งก็คือ *Bacillus subtilis* โดยสามารถแยกได้ 2 ไอโซเลท และเมื่อทดลองนำเอาแบคทีเรียทั้ง2ไอโซเลทมาทำให้บริสุทธิ์และนำไปใส่ในถั่วเหลืองเพื่อให้เกิดการหมัก พบว่าสามารถทำให้เกิดถั่วเน่าได้เป็นอย่างดี ส่วนการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีพบว่าถั่วเน่ามีโปรตีนและไขมันในปริมาณที่สูง และถั่วเน่าที่ทำเป็นแผ่นแล้วนำไปตากแดดสามารถเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องได้เป็นเวลานาน

ภาณุวรรณ (1995) ได้ศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในถั่วเหลืองหมักของไทย พบว่ามีแบคทีเรียหลายชนิดที่เกี่ยวข้อง ตั้งแต่เริ่มการหมักจะพบ *Bacillus* sp. และแบคทีเรียกรัมบวกรูปกลม และเมื่อครบระยะการหมัก 48ชั่วโมง สามารถแยกเชื้อทั้งหมดได้ 20ไอโซเลท พบ *Bacillus* sp. 2 ไอโซเลท กรัมบวกรูปกลม 13 ไอโซเลท สามารถสร้างกรดได้ กรัมลบรูปแท่ง 5ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยดูจากการสร้างวงใสในอาหารแข็ง skim milk คัดเชื้อได้ 12ไอโซเลท และพบว่า *Bacillus* sp. No.1 มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด 80.45 μg/ml/min และมีอัตราการเจริญสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง

การศึกษาการผลิต γ-polyglutamic acid

Thorne *et al.*, (1953) ได้ศึกษาสภาวะสำหรับการผลิต glutamyl polypeptide ซึ่งผลิตโดย *Bacillus anthracis* ในอาหารเหลวสังเคราะห์ ซึ่งพบว่าสภาวะที่ดีที่สุดสามารถผลิตได้ 1.0-1.5 mg/ml และยังพบความแตกต่างระหว่าง virulent strains, 994 และ m-36 กับ avilulent strain M ดังนี้ 1) สายพันธุ์ 994 และ M-36 ต้องการคาร์บอนไดออกไซด์สำหรับการสังเคราะห์เปปไทด์ในขณะที่สายพันธุ์ M ไม่ต้องการ 2) สายพันธุ์ M ต้องการL-glutamic acid ในปริมาณที่สูง(1-2 mg/ml) สำหรับการผลิตเปปไทด์ในปริมาณมากในขณะที่สายพันธุ์อื่นไม่ต้องการ ถึงแม้ว่า L-glutamic acid ในปริมาณเล็กน้อย (0.05-0.1 mg/ml) จะเป็นตัวช่วยในการกระตุ้นการเจริญในช่วงแรกและพัฒนาต่อไปในการผลิตเปปไทด์ก็ตาม 3) สายพันธุ์ 994 และ M-36 จะผลิตเปปไทด์ในปริมาณมากเมื่อทำการฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นไปพร้อมกับอาหารในขณะที่สายพันธุ์ M จะผลิตเปปไทด์ในปริมาณสูงเมื่อทำการฆ่าเชื้อกลูโคสแยกจากอาหาร และยังพบว่ากรดอะมิโน 3 ชนิด เท่านั้นที่จำเป็นสำหรับการเจริญ คือ leucine, valine และ methionine ส่วน isoleucine และ phenylalanine ไม่จำเป็นสำหรับการเจริญแต่จำเป็นในการผลิตเปปไทด์ในปริมาณที่สูง

Leonard *et al.*, (1958) ได้ศึกษาผลของโลหะประจุบางชนิดต่อการผลิตพอลิเปปไทด์ของ glutamyl โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่าการสังเคราะห์พอลิเปปไทด์ขึ้นอยู่กับโลหะประจุที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการเติม Mn^{2+} ปริมาณ $1.5x10^{-7}M$ ทำให้มีอัตราการเจริญสูงสุด แต่ผลผลิตของพอลิเปปไทด์จะต่ำ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Mn^{2+} เป็น $6.15x10^{-4}M$ พบว่าสามารถผลิตพอลิเปปไทด์ได้สูงที่สุด ในทำนองเดียวกันเมื่อเติม Ca^{2+} ปริมาณ $1.02x10^{-3}M$ จะให้ผลเช่นเดียวกับการให้ Mn^{2+} ในปริมาณที่เพียงพอกับการเจริญและให้ผลผลิตพอลิเปปไทด์สูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนของ D-glutamic acid ในสายพอลิเปปไทด์นั้นไม่ได้ขึ้นกับความเข้มข้นของ Ca^{2+}แต่จะเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 38-86% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Mn^{2+}, Co^{2+}หรือ Zn^{2+} ส่วนประจุอื่นๆของสาร อนินทรีย์ในอาหารไม่ได้มีผลต่ออัตราส่วนของ D- หรือ L- glutamic acid ในสายพอลิเปปไทด์

Hara *et al.*, (1986) ได้ศึกษาการกระจายของพลาสมิดในการผลิต PGA ของสายพันธุ์ *Bacillus* ที่แยกจาก natto ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับถั่วเน่าของไทย พบว่าสามารถแยกสายพันธุ์ *Bacillus* จากถั่วเน่าที่สามารถผลิต PGA ได้ 4 ไอโซเลท และมี 3ไอโซเลทที่ไม่ต้องการไบโอตินในการเจริญเติบโต และทั้ง 4ไอโซเลทสามารถผลิต γ-glutamyltranspeptidase (γ-GTP)ได้ในปริมาณสูง และพบว่า พลาสมิด น้ำหนักโมเลกุล และรูปแบบจำเพาะของแต่ละไอโซเลทมีความแตกต่างกันทุกอย่าง ซึ่งถั่วเน่าพลาสมิดถูกพบโดยการ hybridized กับ natto พลาสมิด pUH1 ที่มียีน γ-GTP ซึ่งเป็นตัวควบคุมในการสร้าง PGA ใน *B. subtilis* (natto) ชิ้นส่วนของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วย HindIII สามารถจับกับ probe ได้มากกว่าถั่วเน่าพลาสมิด แต่บางชิ้นส่วนก็จับไม่ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า natto พลาสมิด มีการกระจายอย่างมากใน *Bacillus* ที่สามารถผลิต PGA ซึ่งบางทีอาจมีการพัฒนามาจากสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นการกระจายของ natto พลาสมิดใน *Bacillus* สายพันธุ์ที่ผลิต PGA อาจช่วยให้เห็นความแตกต่างของ *B.subtilis* จาก *B. subtilis* (natto)

Cheng *et al.*, (1989) ได้ศึกษาการผลิต γ-polyglutamic acid โดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* A35 ซึ่งเป็นแบคทีเรียพวก denitrifying bacteria ภายใต้สภาวะ denitrification พบว่าสามารถผลิต PGA ได้เท่ากับ 8 mg/ml ในอาหารที่ใช้กลูโคสและแอมโมเนียมคลอไรด์หรือกลูตามิกแอซิด เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ และยังพบว่าแบคทีเรียนี้สามารถผลิต PGA ในสภาวะที่มีออกซิเจนได้อีกด้วย เมื่อนำ PGA มาทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีอัตราส่วนระหว่าง D-glutamic acid และ L-glutamic acid เท่ากับ 4:1 โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ $3x10^{5}$ส่วนในการศึกษากับ *Bacillus* ชนิดอื่นๆพบว่ามีบางชนิดสามารถผลิตกรดอะมิโนอิสระได้ในสภาวะมีออกซิเจน แต่ก็ไม่สามารถผลิตเมื่ออยู่ในสภาวะที่ใช้ไนเตรทในการหายใจ

Ogawa *et al.*, (1991) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ γ-glutamyltranspeptidase (γ-GTP) (EC2.3.2.2) ซึ่งได้จากน้ำเลี้ยงของ *Bacillus subtilis* (natto) พบว่า γ-GTP ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 45,000 และ 22,000 ในส่วน N-terminal จะเป็นส่วนที่มีขนาดเล็กซึ่งเหมือนกับ γ-GTP ที่แยกจากน้ำเลี้ยงของ *Escherichia coli* อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ชนิดนี้คือ 60 องศาเซลเซียส และ 8.5 และเอนไซม์ชนิดนี้จะสูญเสียการทำงานเมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 8.0 เป็นเวลา 15 นาที เอนไซม์ γ-GTP นี้จะใช้ glutamine เป็นตัวให้และตัวรับ γ-glutamyl เพื่อการสังเคราะห์ γ-PGA และยังพบว่า dipeptide ยังเป็นตัวรับ γ-glutamyl ในการสังเคราะห์ γ-PGA ได้ดีกว่ากรดอะมิโนอิสระ

Goto and Kunioka (1992) ศึกษาการผลิต γ-polyglutamic acid จาก *Bacillus subtilis* IFO 3335 โดยใช้กรดซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนลงใน glutamic acid medium ที่มี L-glutamic acid อยู่ด้วย พบว่าสามารถผลิต PGA บริสุทธิ์ได้ในปริมาณมาก แต่เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะเกิด by-product ประเภท polysaccharide ขึ้น และเมื่อทำการ hydrolysis PGA โดยละลายน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 80, 100 และ 120 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิสูงจะสามารถ hydrolyzed ได้เร็ว และแปรผันตามระยะเวลาที่ใช้ ส่วนการสลายที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ต้องใช้เวลานานถึง 60 นาทีจึงเริ่มย่อยสลาย ซึ่งการย่อย PGA นี้เป็นการย่อยสลายพันธะแบบสุ่ม

Kubota *et al.*, (1993) ได้ศึกษาการผลิต γ-PGA โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* F-2-01 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บจากมหาวิทยาลัยโอซาก้า พบว่าเมื่อนำมาเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 2% veal infusion broth และ 0.1 % glucose ใน rotary shaker อัตราเร็ว 220 รอบต่อนาที เมื่อเติม L-glutamic acid 7.0 % สามารถผลิต PGA ได้มากที่สุด 50 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำเอา PGA มาวิเคราะห์โดย HPLC พบว่ามีอัตราส่วนระหว่าง D-glutamic acid และ L-glutamic acid เท่ากับ 69 :31

Birrer *et al.*, (1994) ได้ศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางกายภาพและทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus licheniformis* 9945 A ในการผลิต γ-PGA โดยใช้ L-glutamate, citrate และ glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้วิธี gel permeation chromatography (GPC) ในการวัดปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลของ PGA พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์จะอยู่ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก อัตราการผลิต PGA อยู่ในช่วงระหว่าง 48-96 ชั่วโมงเท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยมีปริมาณ PGA สูงสุดเท่ากับ 11 กรัมต่อลิตรที่เวลา 96 ชั่วโมง และ pH จะลดลงจาก 7.4 เป็น 5.5 ในเวลา 42 ชั่วโมง เพราะว่ามีการผลิตกรดอะซิติกขึ้นประมาณ4.5 กรัมต่อลิตร และยังพบสารพวก 2,3–butanediol ซึ่งเป็น by-product เกิดขึ้นในช่วง 42 ชั่วโมงตลอดจนถึง 96 ชั่วโมง แสดงว่าปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอกับกระบวน

การ metabolism และเมื่อทดลองเอาแหล่งคาร์บอนแต่ละอย่างออกโดยไม่ได้ควบคุม pH พบว่าเมื่อนำ citric, L-glutamate และ glycerol ออก ปริมาณ PGA จะเท่ากับ 2.3, 9.0 และ 4.0 กรัมต่อลิตร และเมื่อเติม 4 % โซเดียมคลอไรด์ลงในอาหารจะทำให้น้ำหนักโมเลกุลของ PGA สูงขึ้นและปริมาณการผลิตจะต่ำลง

Cromwick *et al.*, (1996) ได้ศึกษาผลของ pH และอัตราการให้อากาศสำหรับการผลิต γ-PGA โดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* ใน batch fermenter พบว่าเชื้อสามารถผลิต PGA ได้สูงสุด 15 กรัมต่อลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง pH 6.5 แต่เมื่อปรับ pH ให้เป็น 5.5 และ 7.4 ปริมาณ PGA จะลดลงเหลือประมาณ 5 กรัมต่อลิตร แต่การเปลี่ยนแปลง pH นี้มีผลน้อยมากต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุล และ stereochemistry ของ PGA ส่วนผลของ อัตราการให้อากาศเมื่อเมื่อเพิ่มอัตราการกวนจาก 250 รอบต่อนาทีไปจนถึง 800 รอบต่อนาที และการให้อากาศจาก 0.5ลิตรต่อนาที เป็น 2.0 ลิตรต่อนาที น้ำหนักแห้งของเซลล์จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (จาก 2 กรัมต่อลิตร เป็น 4 กรัมต่อลิตร) และปริมาณ PGA เพิ่มจาก 6.3 กรัมต่อลิตร เป็น 23 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยมีอัตราการผลิต PGA สูงสุด เท่ากับ 0.09-0.11 h^{-1}

Hara *et al.*, (1995) ได้วิเคราะห์พลาสมิดในการผลิต γ-polyglutamate ของ *Bacillus* ที่แยกได้จากอาหารที่ทำจากถั่วเหลืองหมักของเนปาลที่เรียกว่า kinema พบว่าพลาสมิด, pNKH ที่มี open reading frame (ORF) ยาว 1,281 bp และภายในสายเปปไทด์ มี 427 กรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุล 50,251 ซึ่งเมื่อนำมาเทียบกับพลาสมิด pUH1PSF ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ควบคุมการผลิต PGA ของ *Bacillus subtilis* (natto) พบว่าพอลิเปปไทด์ของ pNKHORF ยาวกว่า 7 residues และมีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกัน 92 % ซึ่งเป็นข้อยืนยันได้ว่าพลาสมิด pNKH ของ *Bacillus* ที่แยกได้จาก kinema เป็นตัวควบคุมการสร้าง PGA

Ito *et al.*, (1996) ได้ศึกษาการผลิต γ-PGA จาก glutamic acid อิสระ โดย *Bacillus subtilis* TAM-4 ซึ่งแยกได้จากดิน พบว่าสามารถผลิต PGA ได้ปริมาณสูงสุดที่ 22.1 mg/ml เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วย 1.8 % แอมโมเนียมคลอไรด์ และ 7.5 % ฟรุกโตส ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ใน rotary shaker อัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที และเมื่อทำการศึกษาองค์ประกอบของ PGA ในช่วงระยะเวลาต่างๆตั้งแต่ 36 ชั่วโมงจนถึง 96 ชั่วโมง โดยวิธี SDS-PAGE, gel permeation chromatography และการวัดความหนืด พบว่าอัตราส่วนระหว่าง D-glutamic acid และ L-glutamic acid เท่ากับ 78 :22 ตลอดระยะเวลาที่วัดแต่ปริมาณความหนืดและมวลโมเลกุลจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยที่อัตราส่วนระหว่าง D-/L- ไม่เปลี่ยนแปลง

Yamaguchi *et al.*, (1996) ได้ศึกษาการหา γ-PGA โดยวิธี SDS-PAGE ซึ่งผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* (natto) พบว่า PGA มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 275,000 ซึ่งค่าที่ได้เกือบจะเท่ากันในแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่สามารถผลิต PGA ได้ ในการวัดปริมาณ PGA พบว่าเชื้อจะเริ่มผลิตในระยะต้นของ stationary phase คือที่เวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งวิธี SDS-PAGE นี้ต้องทำการย่อยสลาย PGA โดยกรดและความร้อนรวมทั้งใช้ปฏิกิริยา cross-linking กับ carbodiimide และ ethylenediamine ซึ่งจะทำให้สามารถมองเห็นได้ใน acrylamide gel

Ogawa *et al.*, (1997) ได้ศึกษาผลการผลิต γ-PGA โดย *Bacillus subtilis* (natto) ใน jar fermenter ขนาด 30 ลิตร พบว่าเชื้อสามารถผลิต PGA ได้สูงสุดที่ 35 mg/ml โดยเติม 3 % โซเดียมคลอไรด์ เพื่อป้องกันการเกิดฟอง และเพิ่มปริมาณการให้อากาศรวมทั้งปริมาณกรดกลูตามิกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งปริมาณกรดกลูตามิกที่เติมลงไปนั้นจะแปรผกผันกับปริมาณ PGA ในระยะ stationary phase และยังพบว่าเมื่อเติม ^{14}C-L-glutamic acid ลงในอาหารสำหรับการสังเคราะห์ PGA นั้น สามารถตรวจพบได้ใน PGA ที่เชื้อผลิต ดังนั้นกรดกลูตามิกที่เติมลงในอาหารจะถูกนำเข้าไปในเซลล์และรวมกันเป็นพอลิเมอร์ ซึ่งกรดกลูตามิกที่เติมลงไปก็คือองค์ประกอบของพอลิเมอร์นั่นเอง

Ko and Gross (1998) ได้ศึกษาผลของกลูโคส และกลีเซอรอลต่อการผลิต γ-PGA โดยเชื้อ *Bacillus lincheniformis* ATCC 9945a ซึ่งเป็นแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่ผลิต PGA และได้ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบสำหรับการผลิต PGA พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่ากลีเซอรอลสำหรับการเจริญของเซลล์และกลูโคสยังถูกนำไปใช้ได้เร็วกว่ากลีเซอรอล, ซิเตรท หรือกลูตาเมต อย่างไรก็ตามเมื่อผสมกลูโคสกับกลีเซอรอลในอาหารทำให้การผลิต PGA เพิ่มขึ้น แต่กลไกในการนำกลีเซอรอลไปใช้นั้นยังไม่แน่นอน ในการเติมกลูตาเมต มีความสัมพันธ์กับแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเปลี่ยนไปเป็น PGA โดยกระบวนการ glycolysis ของกลูโคสเข้า acetyl Co-A และ TCA cycle โดยการ metabolized ผ่าน TCA cycle จาก γ-ketoglutarate ซึ่งเป็น precursor โดยตรงของกลูตาเมต

Tahara *et al.*, (1998) ได้ศึกษาวิถีการสังเคราะห์ γ-PGA ของ *Bacillus subtilis* NR-1 ที่แยกได้จาก natto สามารถผลิต PGA ได้ 30 กรัมต่อลิตรในสภาวะที่เหมาะสม และปริมาณการผลิต PGA จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเติม L-glutamic acid (Glu) ลงในอาหาร ในการทดลองได้ใช้ ^{14}C-L-Glu เป็นตัวทดสอบซึ่งสามารถตรวจพบรวมอยู่ใน PGA ที่ผลิตออกมาแสดงว่าการสังเคราะห์ PGA เกิดจาก L-Glu ในอาหารนั่นเอง นอกจากนี้ยังพบว่าในการสังเคราะห์ ^{14}C-PGA จาก ^{14}C-L-Glu จำเป็นต้องใช้ ATP และMg^{2+}ร่วมด้วย และการกระตุ้น L-Glu จะเกิดขึ้นครั้งแรกที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้เกิดกระบวนการ racemization และ polymerization ต่อไป

Ashiuchi *et al.*, (1999) ได้ศึกษาการผลิต γ-polyglutamic acid โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* IFO 3336 โดยการ cloning gene ที่ควบคุมการผลิต PGA ใน *Escherichia coli* โดยใส่ยีนทั้ง 3 อย่าง คือ pgs BCA ที่มีลักษณะเหมือนกับยีน cap BCA ของ *Bacillus anthracis* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ PGA ของ *Bacillus subtilis* IFO3336 ใน *E.coli* และ *E.coli* สามารถผลิต PGA และปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ แสดงว่าทั้งยีน pgsB, pgsC และ pgaA มีความจำเป็นในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ เมื่อเติม Mn^{2+} แทน Mg^{2+} จะมีการสังเคราะห์พอลิเมอร์ในอาหารเพิ่มมากขึ้น การแสดงออกร่วมกันของ glutamate racemase gene ใน *E.coli* กับ ยีน pgs BCAทำให้การผลิต PGA เพิ่มมากขึ้นและเพิ่มปริมาณ D-glutamic acid ใน PGA ด้วย การผลิต PGA ของ *E.coli* นี้จะได้ PGA ที่มีโมเลกุลใหญ่กว่า PGA ที่ผลิตจาก *B.subtilis* IFO 3336

สารอื่นจากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก

Ohno *et al.*, (1995) ได้ศึกษาการผลิต surfactin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะพวก lipopeptide จาก *Bacillus subtilis* ที่ทำการ recombinant และทำการหมักถั่วเหลืองในสภาพอาหารแข็ง พบว่าในการใช้ *Bacillus subtilis* MI113 ซึ่งใส่พลาสมิด pC112 ที่มียีน Ipa-14 ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการผลิต surfactin ลงใน *B.subtilis* RB14 ซึ่งเป็น wide-type พบว่าปริมาณความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตคือ 82 % และ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณ surfactin ที่ผลิตได้เท่ากับ 2.0 g/kg (น้ำหนักเปียก) ซึ่งเพิ่มขึ้นจากการผลิตของ wide-type 8 เท่า และยังพบว่าการหมักแบบของแข็งนี้ให้ผลผลิตมากกว่าการหมักแบบ submerged ถึง 4-5 เท่า

Fukutake *et al.*, (1996) ได้ศึกษาปริมาณ genistein และ genistin ในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ของถั่วเหลือง โดยเชื้อว่าสารนี้มีบทบาทในการต่อต้านมะเร็ง โดยพบว่าในถั่วเหลืองและแป้งถั่วเหลืองมีสารนี้ประมาณ 4.6-18.2 และ 200.6-968.1 μg/g อาหาร ในน้ำถั่วเหลืองและเต้าหู้มี 1.9-13.9 และ 94.8-137.7 μg/g อาหาร ส่วนในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักพบว่า miso และ natto มีปริมาณ genistein 38.5-229.1 μg/g และมีปริมาณ genistin 71.1-492.8 μg/g อาหาร β-glycosyl bond ของ genistin จะถูกทำให้แตกเป็น genistein โดยจุลินทรีย์ในระหว่างการหมัก miso และ natto จากการศึกษาอัตราการบริโภคถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองของคนญี่ปุ่นเท่ากับ 1.5-4.1 และ 6.3-8.3 mg/คน/วัน ซึ่งมากกว่าชาวอเมริกันและยุโรปตะวันตก ซึ่งมีอัตราการเป็นมะเร็งเต้านม, มะเร็งลำไส้และมะเร็งต่อมลูกหมากสูงกว่าชาวญี่ปุ่น

Wang and Fung (1996) ได้ศึกษาอาหารหมักประเภท alkaline ซึ่งมีแพร่หลายในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และในทวีปอัฟริกา โดยอาหารดังกล่าวทำขึ้นจากวัตถุดิบหลายชนิด เช่น natto ของญี่ปุ่น, ถั่วเน่าของไทย และ kenima ของเนปาล ทำมาจากถั่วเหลือง ogiri ของอัฟริกาทำ

จากเมล็ดแตงโม, owah ทำจากเมล็ดฝ้าย pidan ทำจากไข่สดของสัตว์ปีก โปรตีนจากวัตถุดิบในอาหารประเภทดังกล่าวจะแตกตัวเป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์ แอมโมเนียจะถูกปล่อยออกมาในระหว่างกระบวนการหมัก ดังนั้นจึงทำให้อาหารมี pH เพิ่มขึ้นและมีกลิ่นที่รุนแรง การหมักจะเกิดจากแบคทีเรียหลายชนิดแต่ชนิดที่สำคัญ คือ *Bacillus subtilis* แต่มีอาหารบางชนิดที่ใช้เชื้อบริสุทธิ์ในการหมัก เช่น natto ใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* var *natto* ในการผลิต ส่วนใน pidan ไม่พบเชื้อ *Bacillus subtilis* แต่จะพบ *Staphylococcus* spp. 4 ชนิด คือ *S. cohnii,, S. epidermidis, S. haemolyticus* และพบ *Bacillus* spp. 2 สายพันธุ์ คือ *B. cereus* และ *B. macerans* ซึ่งจาการศึกษาต่อมาพบว่า *Staphylococcus* spp. ไม่มีผลต่อกระบวนการหมักแต่เป็นเชื้อที่ปนเปื้อนมาเท่านั้น

Sarkar *et al.*, (1997) ได้ศึกษาปริมาณของ oligosaccharide ในถั่วเหลืองระหว่างกระบวนการผลิต kinema ที่เป็นอาหารพื้นเมืองของชาวเนปาล โดยใช้วิธี high performance liquid chromatography และใช้ hypersil NH_2 เป็นคอลัมน์ พบว่าในถั่วเหลืองดิบนั้นมีปริมาณ sucrose, raffinos และ stachyose เท่ากับ 6.3, 1.9 และ 4.3 % ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด คิดเป็นอัตราส่วนเท่ากับ 3.3 : 1 : 2.3 และพบว่าการต้มถั่วเหลืองจะช่วยลดปริมาณของ oligosacchride ลง 73-88 % แต่ก็ยังต่ำกว่าการหมักถั่วเหลืองซึ่งทำให้ระดับของ oligosaccharide ลดต่ำลงจนถึงระดับที่ไม่สามารถวัดค่าได้ (1.0 g kg^{-1}dry wt) ดังนั้นการหมักจึงช่วยกำจัดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ของผู้บริโภคได้เป็นอย่างดี

Sarkar *et al.*, (1997) ได้ศึกษากรดอะมิโนใน kinema ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญประกอบด้วย กรดอะมิโนที่เป็นกรด เบส และอะโรเมติก เท่ากับ 30.8, 15.1 และ 13.0 %)ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 36 % ของน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นเทียบเท่ากับโปรตีนในน้ำนมและไข่ ในถั่วเหลืองที่ยังไม่ได้ทำการหมักพบว่ามีปริมาณกรดอะมิโนอิสระเพียง 0.2 % ของน้ำหนักแห้งทั้งหมดเท่านั้น แต่เมื่อเกิดกระบวนการหมักโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* ทำให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้น 60 เท่า โดยพบว่ากรดอะมิโนที่เป็นกรด hydrophobic และพวกไม่มีขั้วจะเพิ่มขึ้นแต่กรดอะมิโนพวกเบส hydrophillic และกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบจะหมดไป นอกจากนี้เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสพบว่าจะทำให้การปล่อยกรดอะมิโนอิสระเป็นไปอย่างลำบาก

Matsumoto *et al.*, (2000) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการผลิต protopectinases จาก *Bacillus subtilis* โดยใช้แป้งถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อนำเอนไซม์ชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ในการฟอกสีฝ้าย ในการทดลองได้ใช้ *Bacillus subtilis* IFO3134 เลี้ยงในอาหารแป้งถั่วเหลืองที่สกัดเอาไขมันออกแล้ว พบว่าเชื้อสามารถผลิต Ppase ได้ 3 ชนิด คือ Ppase-C ,-N ,-R ซึ่งแสดงกิจกรรมของ endo-arabinase, pectate-lyase และ pectin-lyase ตามลำดับ และยังพบว่าความ

เป็นเบสและการใช้ autoclave กับแป้งถั่วเหลืองมีผลต่อการผลิตเอนไซม์เป็นอย่างมาก ถ้าอาหารมีความเป็นเบสจะทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลง แต่กิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจนถึง 2200-2400 U/ml เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารมีปริมาณแป้งถั่วเหลือง 40 g/l และ autoclave เป็นเวลา 45-60 นาที

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University