สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกแบคทีเรียจากถั่วเน่าที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการย่อยแป้ง

Screening of Amylase Producing Bacteria from Traditionally Fermented Soybean (Thua-nao) as Potential Starter Culture in Starch Degradation

ผศ. ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

RCH
0246ก
2556

เลขหมู่ 137999
เลขทะเบียน
วัน.เดือน.ปี - 8 ก.ย. 2558

b 12703783
i

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2556
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การคัดเลือกแบคทีเรียจากถั่วเน่าที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการย่อยแป้ง
แหล่งทุน งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
ประจำปีงบประมาณ 2556 จำนวนเงินที่ได้รับการสบับสนุน 80,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ตุลาคม 2555 ถึงกันยายน 2556
หัวหน้าโครงการ และหน่วยงานต้นสังกัด
ผศ. ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก
คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถประสงค์เพื่อทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในสร้างเอนไซม์อะไมเลส โดยคัดแยกจากถั่วเน่าจำนวน 9 ตัวอย่าง และนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งเบื้องต้นบนอาหาร starch agar โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสรอบโคโลนีที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน และคำนวนหาค่า hydrolysis capacity (HC) จากนั้นนำเชื้อที่คัดเลือกได้มาทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว nutrient broth โดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) และวัดปริมาณโปรตีน และทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด และแป้งข้าวจ้าว จากการศึกษาพบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 179 ไอโซเลท ในจำนวนนี้มี 103 ไอโซเลทที่ให้ผลการเกิดโซนในรอบโคโลนี คัดเลือกไอโซเลทที่มีค่า HC สูงสุด คือไอโซเลท 1-16, 5-4, 5-6, 5-7, 5-20, 6-6, 7-1, 7-3, 7-13, 7-14 และ 9-11 ตามลำดับ นำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลวและทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งต่างๆ พบว่าทุกไอโซเลทสร้างเอนไซม์อะไมเลส และย่อยแป้งได้ทุกชนิด และไอโซเลท 5-20, 6-6 และ 7-1 พบมีค่ากิจกรรมของย่อยแป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด และแป้งข้าวจ้าวได้สูงสุด นำมาระบุสายพันธุ์ของเชื้อด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA พบว่า ไอโซเลท 5-20, 6-6 และ 7-1 คือ *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* และ *Bacillus cereus* ตามลำดับ

คำสำคัญ : แบคทีเรียบาซิลลัส. ถั่วเน่า อะไมเลส แป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Research Title: Screening of Amylase Producing Bacteria from Traditionally Fermented Soybean (Thua-nao) as Potential Starter Culture in Starch Degradation

Researcher: Assist. Prof. Dr. Aphacha Jindaprasert

Faculty: Agro-Industry **Department:** -

ABSTRACT

The aim of this research was to isolate of amylase producing bacteria from 9 traditionally fermented soybean (Thua-nao) samples. All of bacteria isolates were examined for amylase production on starch agar staining with Gram's iodine solution, calculated of hydrolysis capacity (HC) value, determined of reducing sugar by dinitrosalicylic (DNS) method and protein concentration by Bradford test kit in nutrient broth, and test ability for degradation of tapioca, corn and rice starches. One hundred and three of 179 isolates showed clear zone with Gram's iodine. The high HC value isolates, 1-16, 5-4, 5-6, 5-7, 5-20, 6-6, 7-1, 7-3, 7-13, 7-14 and 9-11 were selected to determine amylase production in nutrient broth. The result showed that three isolates, 5-20, 6-6 and 7-1 could degrade tapioca, corn and rice starches at high level of enzyme specific activities. In addition, isolates, 5-20, 6-6 and 7-1 were identified as *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus*, respectively, using 16s rRNA analysis.

Keywords : *Bacillus* species. Fermented Soybean (Thua-nao), Amylase, Starch

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2556

ขอขอบคุณ นางสาวศิริพรรณ มิ่งขวัญ นางสาวศุภัทรกาญจน์ แนวณรงค์ นางสาวภัทราภรณ์ ธนาการสิทธิ์ และนางสาวสรวีย์ เกียรติศุภมงคล นักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่ช่วยเหลือในการเก็บข้อมูลงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณกำลังใจจากครอบครัวคุณพ่อ คุณแม่ น้องสาว ผศ. กรรณ จินดาประเสริฐ และเด็กชายกัณต์ณภัค จินดาประเสริฐ ที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

อพัชชา จินดาประเสริฐ

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ฉ

สารบัญภาพ ..... ช

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 แนวคิด และทฤษฎีหลัก 3

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 10

3.1 วัตถุดิบ 10

3.2 สารเคมี และอาหารเชื้อ 10

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง 11

บทที่ 4 ผลการวิจัย 14

4.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่า 14

4.2 การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากถั่วเน่า 14

4.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อที่แยกได้ 21

4.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 25

5.1 สรุปผลการวิจัย 25

5.2 ข้อเสนอแนะ 25

เอกสารอ้างอิง 26

ภาคผนวก 27

ภาคผนวก ก การตรวจวิเคราะห์ 28

ภาคผนวก ข สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย 35

ประวัตินักวิจัย 36

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ส่วนประกอบทางเคมีของถั่วเน่า 4

2.2 ลักษณะของอะไมโลสและอะไมโลเพกทิน 6

2.3 เปรียบเทียบแอกทิวิตีสัมพันธ์ของอะไมเลสทั้ง 3 ชนิดต่อหน่วยหมู่รีดิวซ์ที่เกิดขึ้น 7

2.4 การย่อยสลายแป้งเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่างๆ 7

3.1 แหล่งที่มาและสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการทำถั่วเน่า 10

4.1 ไอโซเลทที่แยกได้จากถั่วเน่าที่พบที่สร้างโซนใสบนอาหาร starch agar และค่า hydrolysis capacity (HC) 15

4.2 การจัดกลุ่มตามค่า hydrolysis capacity (HC) ของเชื้อที่พบการเกิดโซนใสรอบโคโลนีบนอาหาร starch agar ที่ทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน จำนวน 103 ไอโซเลท 19

4.3 ค่า hydrolysis capacity (HC) ของเชื้อ จำนวน 11 ไอโซเลท บนอาหาร starch agar 21

4.4 กิจกรรรมเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อแต่ละไอโซเลท 22

4.5 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากการย่อยแป้งต่างๆ ของเชื้อแต่ละไอโซเลท 23

4.6 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล 24

ตารางภาคผนวกที่

ก1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร กับสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ 31

ก2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร กับปริมาณโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

4.1 ลักษณะการเกิดโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อบนอาหาร starch agar ที่ทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน 20

ภาพภาคผนวกที่

ก1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร กับปริมาณกลูโคส 31

ก2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 595 กับ ปริมาณโปรตีน (mg/ml) 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การพัฒนาเชื้อเพลิงชีวภาพหรือพลังงานชีวภาพ (Bio-fuel or bio-energy) เป็นหนึ่งในเป้าหมายหลักของยุทธศาสตร์การพัฒนาพลังงานของประเทศในปัจจุบัน เพื่อลดการนำเข้าน้ำมันและพึ่งพาตนเองด้านพลังงานให้มากขึ้น เอทานอลหรือไบโอเอทานอล (bio ethanol) สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบจำพวกแป้ง รวมทั้งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและทุกส่วนของพืชสามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลได้ กระบวนการผลิตเอทานอลเริ่มจากการเตรียมวัตถุดิบ ถ้าเป็นประเภทแป้ง จะต้องนำไปผ่านกระบวนการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อน ด้วยการใช้กรดหรือเอนไซม์ จากนั้นจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์โดยใช้เชื้อยีสต์ และทำให้เป็นแอลกอฮอล์บริสุทธิ์โดยการกลั่น

เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) เป็นเอนไซม์ที่นำมาใช้ย่อยวัตถุดิบพวกแป้งให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีโมเลกุลเล็กลง เช่น น้ำตาลมอลโทส (maltose) กลูโคส (glucose) เดกซ์ตริน (dextrin) การผลิตอะไมเลสเป็นการค้าได้จากจุลินทรีย์ มีทั้งเชื้อรา และแบคทีเรีย ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus oryzae* (Amyloglucosidase, Sigma-Aldrich) และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* (Termamyl®, Novozymes) เป็นต้น เอนไซม์อะไมเลสสามารถย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่างๆ รวมทั้งใช้ในขั้นตอนของการผลิตเอทานอล

ถั่วเน่าเป็นอาหารประเภทถั่วเหลืองหมักพื้นเมืองทางภาคเหนือของประเทศไทย ทำมาจากถั่วเหลืองโดยผ่านการต้มจนสุกแล้วนำมาหมักด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติจนมีกลิ่น สี รส และลักษณะเฉพาะตัว กรรมวิธีการหมักถั่วเน่านั้นเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษจากคนรุ่นหนึ่งสู่อีกรุ่นหนึ่ง (ศรีจันทรัตน์ กันทะวัง, 2551) ถั่วเน่าของไทยมีความใกล้เคียงกับนัตโต (natto) ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของประเทศญี่ปุ่น จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักถั่วเน่า คือ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. จากงานวิจัยที่ผ่านมา Chantawannakul et al. (2002) ทำการแยกเชื้อ *Bacillus* sp. จากถั่วเน่าจำนวน 82 สายพันธุ์ พบว่าเป็นเชื้อ *B. subtilis* จำนวน 39 สายพันธุ์ ที่มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส และจากการศึกษาของ Inatsu et al. (2006) ทำการแยกเชื้อ *B. subtilis* จากถั่วเน่าจากแหล่งต่างๆ พบที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส นัตโตไคเนส (nattokinase หรือ subtilisin NAT) และแกมมา-โพลิกลูตามิกแอซิด (gamma-polyglutamic acid)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะทำการแยกแบคทีเรียจากถั่วเน่าที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ในอาหาร starch agar โดยทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

อะไมเลสได้ดี รวมทั้งศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยแป้งชนิดต่างๆ เพื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวมาใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่มีสมบัติในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยแป้งจากถั่วเน่า

1.2.2 เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์และความสามารถในการย่อยแป้งของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรีย

1.2.3 เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ทำการเก็บตัวอย่างถั่วเน่าจากแหล่งต่างๆในภาคเหนือของประเทศ จากนั้นทำการแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยแป้งในอาหาร starch agar ได้ดีนำมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส และความสามารถในการย่อยแป้งชนิดต่างๆ รวมทั้งตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้

1.4.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่า

1.4.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส

1.4.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและความสามารถในการย่อยแป้ง

1.4.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งได้

1.5.2 ทราบกิจกรรมและความสามารถในการย่อยแป้งของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ

1.5.3 ทราบชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ และนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิด และทฤษฎีหลัก

2.1.1 ถั่วเน่า

ถั่วเน่าเป็นอาหารพื้นเมืองของคนล้านนา ที่ทำมาจากถั่วเหลืองโดยผ่านการต้มจนสุกแล้วนำมาหมักด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติจนมีกลิ่น สี รส และลักษณะเฉพาะตัว กรรมวิธีการหมักถั่วเน่านั้นเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษจากคนรุ่นหนึ่งสู่อีกรุ่นหนึ่ง อาจมีการปรับเปลี่ยนทั้งรสชาติและกรรมวิธีให้เหมาะสมกับยุคสมัย ถั่วเน่าเป็นอาหารที่มีประโยชน์ นอกจากใช้เป็นอาหารเสริมรสชาติแล้ว ยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ประกอบด้วย โปรตีน สารอาหารที่ย่อยสลายง่าย และสารอาหารอื่นๆที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ซึ่งเชื่อว่ามีผลในการลดอัตราการเป็นโรคมะเร็งและโรคหัวใจ (ศรีจันทรัตน์ กันทะวัง, 2551)

2.1.1.1ชนิดและส่วนประกอบทางเคมีของถั่วเน่า

การทำถั่วเน่าของแต่ละท้องถิ่นจะมีกรรมวิธีการทำถั่วเน่าแตกต่างกันไปบ้าง แต่โดยทั่วไปชาวบ้านจะนิยมทำถั่วเน่าอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ ถั่วเน่าแบบเปียก และถั่วเน่าแบบแห้ง (ศรีจันทรัตน์ กันทะวัง, 2551)

ถั่วเน่าที่ได้จะมีลักษณะเหมือนนัตโตตรงลักษณะของผลิตภัณฑ์ และไม่มีกลิ่นถั่ว รวมทั้งสีของถั่วเหลืองจะเปลี่ยนจากสีเหลืองออกสีน้ำตาลอ่อน เป็นสีน้ำตาลเทา แต่จะมีลักษณะที่แตกต่างกันกับนัตโตตรงที่ถั่วเน่านิยมนำมาบด แล้วทำให้มีลักษณะคล้ายกะปิ พร้อมทั้งเกลือ และสารปรุงรสอื่นๆ เช่น กระเทียม หอม พริกไทย เป็นต้น แต่การหมักตามพื้นบ้านอาจเกิดปัญหาเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการปนเปื้อนลงไป สำหรับส่วนประกอบทางเคมีของถั่วเน่า แสดงอยู่ในตารางที่ 2.1 (วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2532)

2.1.1.2 จุลินทรีย์และบทบาทที่เกี่ยวข้องในการหมักถั่วเน่า

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักคือ *Bacillus* sp. โดย *Bacillus subtilis* เกี่ยวข้องกับการหมักถั่วเน่า และ *Bacillus natto* ใช้ทำนัตโต ซึ่งนัตโตเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักของชาวญี่ปุ่น (วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2532)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 2.1ส่วนประกอบทางเคมีของถั่วเน่า

ส่วนประกอบ	Paste (% content)	Chips (% dry weight)
โปรตีน	16	36.8
ไขมัน	7.4	14.8
คาร์โบไฮเดรต	11.5	19.4
ไฟเบอร์	5.2	12.9
ขี้เถ้า	2.5	4.9
น้ำ	56.4	11.1

ที่มา: วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต (2532)

2.1.2 เอนไซม์อะไมเลส (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) เป็นเอนไซม์ที่นำมาใช้ย่อยวัตถุดิบพวกแป้งให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีโมเลกุลเล็กลง เช่น น้ำตาลมอลโทส (maltose), กลูโคส (glucose), เดกซ์ตริน (dextrin) ใช้มากในอุตสาหกรรมผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส ลูกกวาด อุตสาหกรรมเครื่องดื่มมีแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมการหมักที่ใช้แป้งเป็นวัตถุดิบ อุตสาหกรรมการผลิตแป้งสาลีสำเร็จรูป (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

2.1.2.1 ชนิดของอะไมเลส

ปราณี อ่านเปรื่อง (2547) ได้แบ่งชนิดของเอนไซม์อะไมเลสออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

1) แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) มีชื่อทางการค้าเป็นที่รู้จักกันว่า Termamyl® และมีชื่อสามัญว่า ไดแอสเทส (diastase) และมีชื่อตามระบบว่า α-1,4-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1 พบทั่วไปทั้งในอาณาจักรพืชและสัตว์ ตลอดทั้งในคน มักพบในส่วนของน้ำลาย ตับอ่อน มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายแป้งเป็นโอลิโกและไดแซ็กคาไรด์ โดยจะถูกย่อยต่อในลำไส้เล็กก่อนที่จะซึมผ่านผนังลำไส้สู่ร่างกายเป็นเอนไซม์ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 50,000 มี Ca^{2+} 1 ตัว ต่อเอนไซม์ 1 โมเลกุล และจะถูกกระตุ้นด้วยฮาโลเจนไอออน เช่น Cl^-, Br^-, F^- มีค่า pK ของหมู่ที่แตกไอออนได้ในบริเวณเร่งอยู่ที่ 6.5-8.0 ซึ่งหมู่ที่ว่านี้อาจเป็นหมู่อิมิดาโซลหรือหมู่อะมิโน แต่เมื่อพิจารณาจากค่า ΔH_{ion} เป็น 4 kcal/mole ดังนั้นน่าจะเป็นหมู่อิมิดาโซล

ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์ในการย่อยสลายก็คือ เจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α-1,4 ในลักษณะตัดภายในสายพอลิเมอร์ ได้ผลผลิตเป็นกลูแคน (glucan) และลิมิตเดกซ์ทริน (limit dextrin) ที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย และยังคงมีโครงรูปเดิม (α-configuration)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

2) เบต้า-อะไมเลส (β-amylase) มีชื่อเรียกตามระบบว่า α-1,4-glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2 ซึ่งพบทั่วไปในพืชชั้นสูง เช่น ข้าวบาร์เลย์ในลักษณะกำลังงอกเป็นข้าวมอลต์ ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ถั่วเหลือง และมันเทศ และมักพบร่วมกับแอลฟา-อะไมเลส มีมวลโมเลกุล 152,000 (กรณีจากมันเทศ) ซึ่งโดยทั่วไปจะมีค่าสูงกว่าแอลฟา-อะไมเลส มี pH optimum ที่ 5.6 จากการพิจารณา pH activity profile มีลักษณะแบบรูประฆังคว่ำที่มีหมู่ที่แตกไอออนได้ที่บริเวณเร่งอยู่ 2 หมู่ คือ ที่ pK_1 = 2.5-3.5 และ pK_2 = 8.0-8.5 นอกจากนี้มีสารพวกซัลไฟดริล (sulfhydryl reagents) เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาการย่อยสลายของเบต้า-อะไมเลสจะเจาะจงต่อพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α-1,4 ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายไปทีละ 1 หน่วยของมอลโทส หรือทีละ 2 หน่วยของกลูโคส และจะหยุดปฏิกิริยาที่พันธะไกลโคซิลที่ α-1,6 ดังนั้นผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาย่อยสลายแป้งหรือไกลโคเจนจะเป็นกลูแคน ลิมิตเดกซ์ทริน และส่วนใหญ่เป็นมอลโทสที่มีโครงรูปต่างไปจากเดิม คือได้ β-configuration หรือ เบต้า-มอลโตส

3) แกมมา-อะไมเลส หรือ กลูโคอะไมเลส หรือ อะมิโลกลูโคซิเดส (γ-amylase, glucoamylase, amyloglucosidase) มีชื่อเรียกตามระบบว่า γ-1,4-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3 เป็นเอนไซม์ที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา มี pH optimum ที่ 4.0-4.4 และมีหมู่ไวปฏิกิริยา 2 หมู่ คือ ที่ pK_1 = 2.9 และ pK_2 = 5.9 รวมทั้งมี ΔH^0_1 = 0, ΔH^0_2 = -0.8 kcal/mole จากค่า pK และ ΔH^0 ที่ปรากฏนี้คาดว่าน่าจะมีหมู่ไวปฏิกิริยาทั้ง 2 หมู่ เป็นหมู่คาร์บอกซิลในลักษณะที่หมู่ที่ 1 เป็น COO^- (เกลือ) และหมู่ที่ 2 เป็น COOH (กรด)

ลักษณะที่สำคัญของปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้งก็คือ สามารถย่อยสลายได้หลายพันธะ ไม่ว่าจะเป็นพันธะไกลโคซิลที่เป็น α-1,4, α-1,6 และ α-1,3 แต่จะช้ากว่า α-1,4 การตัดสายพอลิเมอร์จะเหมือนกับเบต้า-อะไมเลส แต่ตัดปลายสายเข้าไปทีละ 1 หน่วยของกลูโคส ดังนั้นผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่มีโครงรูปต่างไปจากเดิม คือได้ β-configuration หรือ เบต้า-ดี-กลูโคส และส่วนของกลูแคน และลิมิตเดกซ์ทริน

van der Maarel et al. (2002) ได้ทำการแบ่งเอนไซม์อะไมเลสตามการเข้าทำปฏิกิริยากับแป้งเป็น 4 ชนิด ได้แก่

1) เอนไซม์เอนโด-อะไมเลส (endo-amylase) จะเข้าทำการย่อยสลายที่ภายในพันธะ α-1,4 ไกลโคซิดิกของอะไมโลสหรืออะไมโลเพคติน ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส ส่วนเอนไซม์เอ็กโซ-อะไมเลสนั้น

2) เอนไซม์เอ็กโซ-อะไมเลส (exo-amylase) จะเข้าทำการย่อยสลายภายนอกที่พันธะ α-1,4 ได้แก่ เบต้า-อะไมเลส หรือ ย่อยสลายที่พันธะ α-1,4 และ α-1,6 ได้แก่ แกมมา-อะไมเลส หรือ กลูโคอะไมเลส

3) เอนไซม์ดีบรานชิงค์ (debrancing enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ไอโซอะไมเลส (isoamylase) และเอนไซม์พลูลูลาเนส (pullanase) สามารถย่อยพันธะ α-1,6 ไกลโคซิดิกของอะไมโล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

เพคติน ไกลโคเจนเด็กซ์ตรินที่มีกิ่งก้านและสารโอลิโกแซคคาไรด์ได้ แต่ไม่สามารถย่อยพันธะ α-1,6 ไกลโคซิดิกของพลูลูแลนและเบต้า-ลิมิทเด็กซ์ตรินได้

4) เอนไซม์ทรานเฟอเรส (transferases) ได้แก่ เอนไซม์อะไมโลมอลเตส (amylomaltase) และเอนไซม์ไซโคเด็กทรินไกลโคซิลทรานเฟอเรส (cyclodextrin glycosyltransferase) สามารถย่อยพันธะ α-1,4 ไกลโคซิดิก ระหว่างตัวให้กับตัวรับของพันธะไกลโคซิดิกใหม่

ลักษณะของสารตั้งต้น (substrate) ของอะไมเลสเป็นแป้ง ซึ่งประกอบด้วยส่วนของอะไมโลสและไมโลเพกทินดังลักษณะความแตกต่างที่แสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ลักษณะของอะไมโลสและอะไมโลเพกทิน

ลักษณะ	อะไมโลส	อะไมโลเพกทิน
โครงสร้างทั่วไป	เป็นสายตรง แต่อาจไม่ตลอดทั้งสายแต่ช่วงที่เป็นสายตรงยาวมาก จึงไม่ค่อยพบส่วนที่เป็นสาขามากนัก	สายสาขา
ความยาวของสายตรงโดยเฉลี่ย (คิดเป็นจำนวนกลูโคส)	10^3	25-30
อัตราการพอลิเมอไรเซชันของกลูโคส	~10^3	10^4-10^5
การเกิดสีกับไอโอดีน (I_2)	สีน้ำเงินเข้ม	สีม่วงถึงน้ำตาล
เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นมอลโทส (เฉพาะเบต้า-อะไมเลส)	70-80	50-60

ที่มา: ปราณี อ่านเปรื่อง (2547)

2.1.2.2 การวิเคราะห์แอกทิวิตีของอะไมเลส

เมื่อเปรียบเทียบแอกทิวิตีของอะไมเลสทั้ง 3 ชนิดในการย่อยสลายแป้งจะได้ผลดังตารางที่ 2.3 (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

1) แอลฟา-อะไมเลสทำให้เกิดพอลิเมอร์สายสั้นได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากการตัดสายภายในอย่างไม่เป็นระเบียบ พิจารณาจากค่าความหนืดและสีไอโอดีนจะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งต่างไปจากบีตา, แกมมา-อะไมเลส ที่มีลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์แบบตัดจากปลายสายสู่ในสายไปเรื่อยๆ เป็นระเบียบ

2) ค่าการลดความหนืด และสีไอโอดีนที่หายไป ไม่บ่งบอกจำนวนพันธะไกลโคซิลในแป้งที่ถูกย่อยสลาย ด้วยเหตุนี้ในการติดตามแอกทิวิตีของอะไมเลสจึงจำเป็นต้องเปรียบเทียบจากหน่วยของหมู่รีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบแอกทิวิตีสัมพันธ์ของอะไมเลสทั้ง 3 ชนิดต่อหน่วยหมู่รีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

ปฏิกิริยา	แอกทิวิตีสัมพันธ์ คิดต่อหน่วยของหมู่รีดิวซ์ที่เกิดขึ้น		
	แอลฟา-อะไมเลส	เบต้า-อะไมเลส	แกมมา-อะไมเลส
หมู่รีดิวซ์ที่เกิดขึ้น (ขึ้นกับปริมาณเอนไซม์)	คงที่	คงที่	คงที่
การลดความหนืด	เร็ว	ช้า	ช้า
การลดสีม่วงของไอโอดีน	เร็ว	ช้า	ช้า
การเกิดมอลโทส	ช้า	1 (เร็ว)	0 (ไม่มี)
การเกิดกลูโคส	0 (ไม่มี)	0 (ไม่มี)	1 (เร็ว)

ที่มา: ปราณี อ่านเปรื่อง (2547)

2.1.2.3 การใช้อะไมเลสในอุตสาหกรรมอาหาร

ปราณี อ่านเปรื่อง (2547) ได้กล่าวถึงการใช้อะไมเลสในอุตสาหกรรมอาหารมีหลายลักษณะดังรวบรวมในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 การย่อยสลายแป้งเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่างๆ

ผลผลิตของการย่อยสลายแป้ง	**การนำไปใช้ประโยชน์**
มอลโทแดกซ์ทริน	สารเพิ่มความข้น, สารเพิ่มความคงตัว
น้ำเชื่อมผสม (42-63 สมมูลเดกซ์โทรส)	เครื่องดื่ม ลูกกวาด น้ำซอส แยม ไอศกรีม
น้ำเชื่อมมอลโทสสูง	ลูกกวาดชนิดแข็ง
น้ำเชื่อมกลูโคส	เครื่องดื่ม ไวน์ เบียร์
น้ำเชื่อมไอโซกลูโคส (ฟรุกโทสสูง)	น้ำผลไม้ น้ำซอส โยเกิร์ต

ที่มา: ปราณี อ่านเปรื่อง (2547)

ในการผลิตผลผลิตจากแป้งแต่ละประเภทที่จำแนก ดังตารางที่ 2.4 นั้น จะทำได้ต้องเลือกใช้เอนไซม์ให้เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

1) การเจลาทิไนเซชัน (Gelatinization)

เริ่มด้วยการทำให้สารละลายแป้งร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 60°C หรือสูงกว่า ขึ้นกับชนิดแป้งเพื่อให้เม็ดแป้งแตกออกมาละลายกับโมเลกุลของน้ำเกิดเป็นเจล เรียก เจลาทิไนเซชัน ความหนืดจะสูงขึ้น ในขั้นตอนถัดไปจึงต้องลดความหนืดลงด้วยการเติมสารช่วยเจือจาง เช่น กรด และเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

2) การทำให้ใส (Liquefaction)

กระบวนการลดความหนืดของแป้งสุก คือ ทินนิง และเดกซ์ทรินไนเซชันของแป้งที่ผ่านการทำให้สุก (เจลาทิไนเซชัน) โดยลด pH เป็น 1.5-2 และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 140-150°C จะเกิดเจลอย่างสมบูรณ์พร้อมกับมีการย่อยสลายบางส่วน ถ้าในขั้นตอนนี้ใช้เอนไซม์แทนการเพิ่มอุณหภูมิก็จะช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ เอนไซม์ที่ใช้คือ แอลฟา-อะไมเลส ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นมอลโทเดกซ์ทริน เนื่องจากแอลฟา-อะไมเลสตัดพันธะไกลโคซิล α-1, 6 ไม่ได้ยังคงรูปเป็น limit dextrin ที่มีกลูโคส 2-6 หน่วย ใช้เป็นสารเติมเนื้อ และสารเพิ่มความคงตัวในอาหารได้

3) การทำให้หวาน (Sacccharification)

กระบวนการนี้ใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือเบต้า, แกมมา-อะไมเลส เพื่อไฮโดรไลซ์ผลผลิตจากการทำให้ใสให้เกิดผลผลิตของน้ำตาลมอลโทส กลูโคส ขั้นตอนนี้อาจจะต้องเสริมด้วยเอนไซม์ย่อยสาขาของแป้งเพื่อย่อยสลายพันธะ α-1, 6 และ α-1, 3

4) การเปลี่ยนไอโซเมอร์ (Isomerization)

ใช้เอนไซม์ไอโซเมอเรส (isomerases) เพื่อเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรุกโทส หรือไซโลสเป็นฟรุกโทสได้เป็นฟรุกโทสไซรัป หรือไอโซกลูโคส ซึ่งเป็นชื่อเรียกในยุโรป

2.1.2.4 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์

ปราณี อ่านเปรื่อง (2547) กล่าวว่าการผลิตอะไมเลสเป็นการค้าจากจุลินทรีย์ มีทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย สำหรับเชื้อราได้แก่ *Rhizopus sp., A. oryzae A. niger* และ *A. candidus* ส่วนเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *B. subtillus, B. stearothermophilus, B. coagulans, Clostridium* sp. และ *Ps. saccharophila* ในปี ค.ศ. 1965 ที่สหรัฐอมริกามีการผลิตอะไมเลสเป็นอุตสาหกรรมโดยใช้เชื้อ *A. oryzae* เรียกชื่อทางการค้าของเอนไซม์ว่า Taka-amylase

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Chantawannakul et al. (2002) ได้ทำการศึกษาแยกเชื้อ *Bacillus* sp. จำนวน 38 สายพันธุ์จากถั่วเน่าอาหารหมักพื้นบ้านของประเทศไทย พบว่ามี 39 สายพันธุ์ที่ระบุได้ว่าเป็น *B. subtilis* และโปรตีนจาก *B. subtilis* มีกิจกรรมของ protiolytic โดยทดสอบบน skim milk agar เกิดกิจกรรมสูงสุดของ *B. subtilis* ที่สายพันธุ์ 38 (มีพื้นที่เฉลี่ยของ clear zone 480 mm^2) ความเป็นกรดด่าง (pH) และอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ที่ 38 คือ ความเป็นกรดด่าง 6.5 และ 60°C

Amoa-Awua et al. (2005) ได้ทำการแยกเชื้อ *B. subtilis* จำนวน 42 เชื้อ จากถั่วเหลืองหมัก dawadawa สามารถคัดเลือกกิจกรรมของ proteolytic บน skim milk agar, กิจกรรมของ amylolytic บน starch agar และสามารถเจริญได้บน soybean agar ความเป็นกรดด่าง (pH) ของตัวอย่างจะเพิ่มขึ้นจาก 6.37-6.58 ถึง 8.22-8.85 ในระหว่างกระบวนการหมัก ในกระบวนการหมัก พบเชื้อ *Bacillus* ได้เท่ากับ 10^9 cfu/g จากนั้นคัดเลือก *B. subtilis* 24BP2 และ *B. subtilis* FpdP2 มาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมัก ผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้นำเอกสารนี้ไปดัดแปลงเนื้อหา
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

จากการทดสอบด้านรสชาติถั่วเหลืองหมัก dawadawa ที่หมักจาก *B. subtilis* 24BP2 ไม่มีความแตกต่างกับถั่วเหลืองหมักจาก *B. subtilis* FpdP2

Inatsu et al. (2006) ได้อธิบายถึงความหลากหลายของเชื้อ *B. subtilis* ที่พบในถั่วเน่าซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์สูง และส่งเสริมสุขภาพ กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส NAT มีแนวโน้มสูงกว่าสายพันธ์ที่ผลิตนัตโต (natto) ผลิตภัณฑ์ทางการค้าของญี่ปุ่น พบว่าสายพันธุ์ *B. subtilis* เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส ซึ่งพบได้ในถั่วเน่าอาหารหมักทางภาคเหนือของประเทศไทย

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 ถั่วเน่า

ถั่วเน่า เป็นอาหารหมักทางาคเหนือของไทย ใช้เป็นวัตถุดิบในการแยกเชื้อแบคทีเรีย ได้มาจากจังหวัดแพร่ และเชียงใหม่ จำนวน 9 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 3.1 เก็บตัวอย่างถั่วเน่าในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนนำไปทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 3.1 แหล่งที่มาและสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการทำถั่วเน่า

รหัส	แหล่งที่มา	สายพันธุ์ถั่วเหลือง
1	นางต่วน แมตเมือง ต.ป่าแมต อ.เมือง จ.แพร่	เชียงใหม่ 60
2	นางกาญจนา เขียวบุตร ต.บ้านถิ่น อ.เมือง จ.แพร่	สจ. 4
3	นางศรีมูล อภัยกาวี ต.บ้านถิ่น อ.เมือง จ.แพร่	ชัยนาท 60
4	นางบัวเตียว อินทรรุจิกร ต.บ้านถิ่น อ.เมือง จ.แพร่	สจ. 4
5	นางบุหงา แก้วเจริญตระกูล ต.น้ำชำ อ.สูงเม่น จ.แพร่	เชียงใหม่ 60
6	นางนำ เวียงทอง ต.บ้านปง อ.สูงเม่น จ.แพร่	สจ. 4
7	นางสุพิน แสนหลวง ต.สูงเม่น อ.สูงเม่น จ.แพร่	สจ. 4
8	นางสายสมร แก้วเจริญตระกูล ต.บ้านปง อ.สูงเม่น จ.แพร่	เชียงใหม่ 60
9	ตลาดสารภี อ.สารภี จ.เชียงใหม่	ไม่ทราบสายพันธุ์

3.1.2 แป้ง

แป้ง ใช้ในการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งชนิดต่างๆ ได้แก่

- แป้งมันสำปะหลัง (นิวเกรต, ประเทศไทย)
- แป้งข้าวโพด (คนอร์, ประเทศไทย)
- แป้งข้าวเจ้า (นิวเกรต, ประเทศไทย)

3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 สารเคมี

- แอลกอฮอล์ 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- 3,5-dinitrosalicylic acid [DNS] (Carlo erba, Italy)
- Ammonium sulfate [$(NH_4)_2SO_4$] (Merck kGaA, Germany)
- Bradford assay kit (Biorad, USA)
- Bovine serum albumin [BSA] (Fluka, Netherlands)
- Coomassie brilliant blue G-250 (Carlo erba, Italy)
- Glucose (Merck kGaA, Germany)
- Iodine [I^-] (Merck kGaA, Germany)
- Phenol (Merck kGaA, Germany)
- Phosphoric acid (Carlo erba, Italy)
- Potassium iodide [KI] (Merck kGaA, Germany)
- Potassium sodium tartate [$KNaC_4H_4O_6.4H_2O$] (Lab-Scan, Thailand)
- Sodium chloride [NaCl] (Carlo erba, Italy)
- Sodium hydroxide [NaOH] (Carlo erba, Italy)
- Sodium nitrate [$NaNO_3$] (RPE reagente Puro Erba, USA)
- Sodium thiosulfate [$Na_2S_2O_5$] (Ajax Firechem Pty Ltd, Australia)
- Starch (Carlo erba, Italy)

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Agar (S.P. Science, Thailand)
- Beef extract (Merck kGaA, Germany)
- Peptone (Merck kGaA, Germany)
- Yeast Extract (Hardy Diagnostics, USA)

3.3ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่า (Chantawannakul et al., 2002)

นำตัวอย่างของถั่วเน่า 0.1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันบนเครื่องเขย่าให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการตกตะกอน มาทำการเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) โดยใช้เทคนิค spread plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สุ่มเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญและแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ และนำเชื้อที่ได้มาทำการ streak plate บนอาหาร NA เพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้เป็น stock culture ในอาหาร NA slant ที่อุณหภูมิ 4°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

3.3.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 3.3.1 มาทำ point inoculation บนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar จานละ 4 ตำแหน่ง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เททับด้วยสารละลายไอโอดีน (gram's iodine) ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 3 นาที แล้วเทสารละลายไอโอดีนออก ตรวจสอบการเกิดโซนใสรอบโคโลนีบนอาหาร starch agar จากนั้นวัดขนาดและเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อการเกิดโซนใสรอบโคโลนี คำนวนค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสต่อขนาดโคโลนี (hydrolysis capacity, HC) คัดเลือกเชื้อที่มีค่า HC สูง มาทำการตรวจสอบเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อยืนยันผล

การตรวจสอบเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อยืนยันผล ทำโดยถ่ายเชื้อที่มีค่า HC สูงจาก NA slant 1 ลูป ลงในอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที (rpm) อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาวัดค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ 600 นาโนเมตร ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.4 จากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารทดสอบ starch agar ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร เจาะบน starch agar และหยดเชื้อลงในหลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เททับด้วยสารละลายไอโอดีน (gram's iodine) ลงบนจานเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 นาที แล้ว เทสารละลายไอโอดีนออก ตรวจสอบการเกิดโซนใสรอบโคโลนีบนอาหาร starch agar จากนั้นวัดขนาดและเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อการเกิดโซนใสรอบโคโลนี คำนวณหาค่า HC

$$\text{Hydrolysis capacity (HC)} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสรอบโคโลนี (เซนติเมตร)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)}}$$

3.3.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและความสามารถในการย่อยแป้ง

3.3.3.1 การเตรียมสารสกัดเอนไซม์ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

นำเชื้อที่คัดเลือกได้ จากข้อ 3.3.2 มาเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่แยกจากการปั่นเหวี่ยงเป็นสารสกัดเอนไซม์ (crude enzyme)

3.3.3.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (ดัดแปลงจาก Asgher et al., 2007)

ปิเปตสารสกัดเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.3.1 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงใน 0.3 มิลลิลิตรของ 0.1 M Acetate buffer (pH 5) ที่มี 0.2% soluble starch ลงในหลอดทดลอง เติม dinitrosalicylic reagent (DNS) ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์อะไมเลส จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (OD) 540 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

เอนไซม์ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้น โดยเทียบค่ากลูโคสจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก) คำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ (unit of enzyme)โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เทียบค่ากับน้ำตาลรีดิวส์ที่ถูกปล่อยออกมา 1 ไมโครโมล (μmol) ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

3.3.3.3 การวิเคราะห์โปรตีนในสารสกัดเอนไซม์ (Bradford, 1976)

ปิเปตสารสกัดเอนไซม์ที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ในอาหาร NB ข้อ 3.3.3.1 ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ลงใน 1 มิลลิลิตรของสารละลาย Bradford ลงในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดเอนไซม์ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยเทียบค่า BSA จากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

3.3.3.4 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของเอนไซม์อะไมเลส

นำสารสกัดเอนไซม์ จากข้อ 3.3.3.1 มาทดสอบความสามารถของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งชนิดต่างๆ โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวจ้าว และแป้งข้าวเหนียว เป็นสารตั้งต้น ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3.2 แต่เปลี่ยนจาก soluble starch เป็นแป้งชนิดต่างๆ

3.3.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ

นำเชื้อที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและความสามารถในการย่อยแป้งต่างๆ ได้ จากข้อ 3.3.3 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมแกรม และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นส่งเชื้อที่แยกได้ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่า

ตัวอย่างถั่วเน่าที่ใช้เป็นแหล่งของเชื้อแบคทีเรีย ได้จากจังหวัดแพร่และเชียงใหม่ จำนวน 9 ตัวอย่าง จากการศึกษาลักษณะของถั่วเน่า พบว่าถั่วเน่าจาก อ.เมือง จ.แพร่ มีลักษณะเม็ดใหญ่ สีน้ำตาลเข้ม ถั่วเน่าจาก อ.สูงเม่น มีลักษณะเม็ดเล็ก สีเหลืองอ่อนและถั่วเน่าจาก อ.สารภี จ.เชียงใหม่ เป็นถั่วเน่าที่บดและปรุงรสมาแล้ว ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากถั่วเน่า โดยนำถั่วเน่ามาแขย่าในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ และให้ความร้อนที่ 75°C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อทำให้สปอร์ของเชื้อแบคทีเรียงอก จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร nutrient agar (NA) โดยใช้เทคนิค spread plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหาร NA ที่ระดับความเจือจางต่างๆ สุ่มเก็บเชื้อแบคทีเรียที่เจริญและแยกเป็นโตโลนีเดี่ยวจากตัวอย่างๆ ละ 20 โคโลนี มาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิค streak plate ผลการทดลองสามารถแยกและเก็บเชื้อบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 179 ไอโซเลท โดยเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น และทำการเก็บเชื้อไว้เป็น stock culture บนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 4°C

4.2 การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากถั่วเน่า

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากถั่วเน่า จำนวน 179 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสบนอาหาร starch agar ภายหลังเททับด้วยสารละลายไอโอดีน (gram's iodine) พบเชื้อจำนวน 103 ไอโซเลท ที่ให้ผลในการเกิดโซนใสรอบโคโลนีบนอาหาร แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสที่ใช้ย่อยแป้งในอาหาร starch agar ได้ จึงไม่ทำปฏิกิริยากับไอโอดีน เกิดโซนใสรอบโคโลนีขึ้น จากนั้นวัดขนาดและเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อการเกิดโซนใสรอบโคโลนี และคำนวณค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสต่อขนาดโคโลนี (hydrolysis capacity, HC) ดังตารางที่ 4.1 นำเชื้อ 103 ไอโซเลท มาเรียงลำดับและทำการจัดเป็นกลุ่มตามค่า HC สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 (HC มากกว่า 2) มี 11 ไอโซเลท, กลุ่มที่ 2 (HC ในช่วง 1.50 – 1.99) มี 54 ไอโซเลท และกลุ่มที่ 3 (HC ในช่วง 1.00 – 1.49) มี 38 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) จากผลการทดลองพบเชื้อที่มีค่า HC มากกว่า 2 จำนวน 11 ไอโซเลท คือ 1-16, 5-4, 5-6, 5-7, 5-20, 6-6, 7-1, 7-3, 7-13, 7-14 และ 9-11 ตามลำดับ นำเชื้อเหล่านี้มาทำทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเพื่อยืนยันผลต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 4.1 ไอโซเลทที่แยกได้จากถ่วเน่าที่พบที่สร้างโซนใสบนอาหาร starch agar และค่า hydrolysis capacity (HC)

ลำดับที่	ตัวอย่าง	แหล่งที่มา	HC ± SD
1	1-1	อ.เมือง จ.แพร่	$1.7\pm0.251^{18-30}$
2	1-2		$2.42\pm1.028^{31-39}$
3	1-5		$1.82\pm0.241^{27-34}$
4	1-6		$1.22\pm0.040^{1-6}$
5	1-8		1.05 ± 0.040^{1}
6	1-12		$1.45\pm0.054^{7-20}$
7	1-15		$1.82\pm0.234^{24-34}$
8	1-16		$2.05\pm0.246^{31-37}$
9	1-18		$1.99\pm0.096^{35-36}$
10	2-3		$1.58\pm0.043^{12-25}$
11	2-5		$1.46\pm0.021^{5-20}$
12	2-6		$1.67\pm0.161^{18-28}$
13	2-11		$1.49\pm0.062^{6-22}$
14	2-14		$1.45\pm0.053^{5-20}$
15	2-15		$1.47\pm0.125^{5-21}$
16	2-16		$1.11\pm0.039^{1-3}$
17	2-17		$1.50\pm0.139^{6-22}$
18	2-18		$1.34\pm0.130^{1-15}$
19	3-5		$1.35\pm0.205^{1-16}$
20	3-8		$1.50\pm0.035^{6-22}$
21	3-9		$1.51\pm0.197^{13-30}$
22	3-10		$1.53\pm0.208^{7-25}$
23	3-11		$1.50\pm0.054^{6-22}$
24	3-12		$1.60\pm0.029^{13-26}$
25	3-18		$1.63\pm0.139^{14-28}$
26	3-19		$1.42\pm0.277^{4-39}$
27	4-1		$1.21\pm0.045^{1-6}$
28	4-4		$1.64\pm1.057^{14-28}$
29	4-5		$1.75\pm0.084^{20-31}$
30	4-8		$1.60\pm0.024^{13-26}$
31	4-10		$1.46\pm0.026^{5-20}$
32	4-14		$1.67\pm0.193^{18-29}$
33	4-17		$1.72\pm0.079^{18-30}$

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันหมายถึง ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ลำดับที่	ตัวอย่าง	แหล่งที่มา	HC ± SD
34	5-1		$1.39\pm0.039^{[7-17]}$
35	5-2		$1.36\pm0.015^{[7-15]}$
36	5-3		$1.40\pm0.034^{[3-18]}$
37	5-4		$2.33\pm0.160^{[33-18]}$
38	5-5		$1.91\pm0.032^{[27-15]}$
39	5-6		$2.12\pm0.110^{[34-17]}$
40	5-7		$2.63\pm0.200^{[39-40]}$
41	5-8		$1.63\pm0.057^{[14-23]}$
42	5-10		$1.30\pm0.134^{[1-13]}$
43	5-11		$1.53\pm0.034^{[2-23]}$
44	5-12		$1.72\pm0.039^{[19-19]}$
45	5-13		$1.65\pm0.028^{[15-23]}$
46	5-14		$1.98\pm0.077^{[28-15]}$
47	5-15		$1.82\pm0.084^{[27-15]}$
48	5-16		$1.82\pm0.062^{[23-22]}$
49	5-17		$1.99\pm0.114^{[30-16]}$
50	5-19	อ.สูงเม่น จ.แพร่	$1.36\pm0.033^{[2-18]}$
51	5-20		$2.07\pm0.516^{[32-17]}$
52	6-1		$1.83\pm0.281^{[27-24]}$
53	6-5		$1.70\pm0.096^{[17-19]}$
54	6-6		$2.27\pm0.151^{[36-16]}$
55	6-11		$1.54\pm0.052^{[8-23]}$
56	6-13		$1.79\pm0.078^{[27-22]}$
57	6-16		$1.56\pm0.033^{[10-25]}$
58	6-18		$1.51\pm0.520^{[6-23]}$
59	6-20		$1.90\pm0.039^{[26-25]}$
60	7-1		$2.08\pm0.130^{[32-17]}$
61	7-2		$1.93\pm0.112^{[28-25]}$
62	7-3		$2.60\pm0.205^{[40]}$
63	7-4		$1.91\pm0.115^{[27-25]}$
64	7-5		$1.75\pm0.028^{[20-31]}$
65	7-6		$1.90\pm0.120^{[26-25]}$
66	7-7		$1.91\pm0.032^{[26-25]}$

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันหมายถึง ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ลำดับที่	ตัวอย่าง	แหล่งที่มา	HC ± SD
67	7-8	อ.สูงเม่น จ.แพร่	$1.55\pm0.115^{10-25}$
68	7-9		$1.29\pm0.076^{1-12}$
69	7-11		$1.78\pm0.033^{21-32}$
70	7-13		2.76 ± 0.536^{40}
71	7-14		$2.15\pm0.236^{35-37}$
72	7-15		$1.64\pm0.052^{14-28}$
73	7-16		$1.50\pm0.026^{6-22}$
74	7-18		$1.91\pm0.079^{26-35}$
75	7-20		$1.10\pm0.218^{1-3}$
76	8-1		1.04 ± 0.032^{1}
77	8-2		$1.42\pm0.007^{4-19}$
78	8-3		$1.51\pm0.115^{6-24}$
79	8-5		$1.37\pm0.055^{2-17}$
80	8-6		$1.27\pm0.110^{1-11}$
81	8-7		$1.08\pm0.047^{1-2}$
82	8-9		$1.25\pm0.067^{1-10}$
83	8-10		$1.40\pm0.264^{3-18}$
84	8-11		$1.23\pm0.090^{1-8}$
85	8-15		$1.18\pm0.221^{1-5}$
86	8-16		$1.14\pm0.051^{1-4}$
87	8-19		$1.22\pm0.088^{1-7}$

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันหมายถึง ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.
137999

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ลำดับที่	ตัวอย่าง	แหล่งที่มา	HC ± SD
88	9-1	ตลาดสารภี จ.เชียงใหม่	$1.42\pm0.047^{4-19}$
89	9-3		$1.34\pm0.035^{1-14}$
90	9-4		$1.83\pm0.090^{25-34}$
91	9-5		$1.57\pm0.187^{11-25}$
92	9-6		$1.78\pm0.210^{21-32}$
93	9-7		$1.70\pm0.149^{18-30}$
94	9-8		$1.23\pm0.042^{1-9}$
95	9-9		$1.11\pm0.022^{1-3}$
96	9-10		$1.70\pm0.185^{18-30}$
97	9-11		$2.21\pm0.087^{33-37}$
98	9-12		$1.54\pm0.135^{9-25}$
99	9-13		$1.30\pm0.094^{1-13}$
100	9-14		$1.28\pm0.014^{1-12}$
101	9-15		$1.47\pm0.033^{8-25}$
102	9-16		$1.69\pm0.172^{22-32}$
103	9-17		$1.62\pm0.035^{14-27}$

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันหมายถึง ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

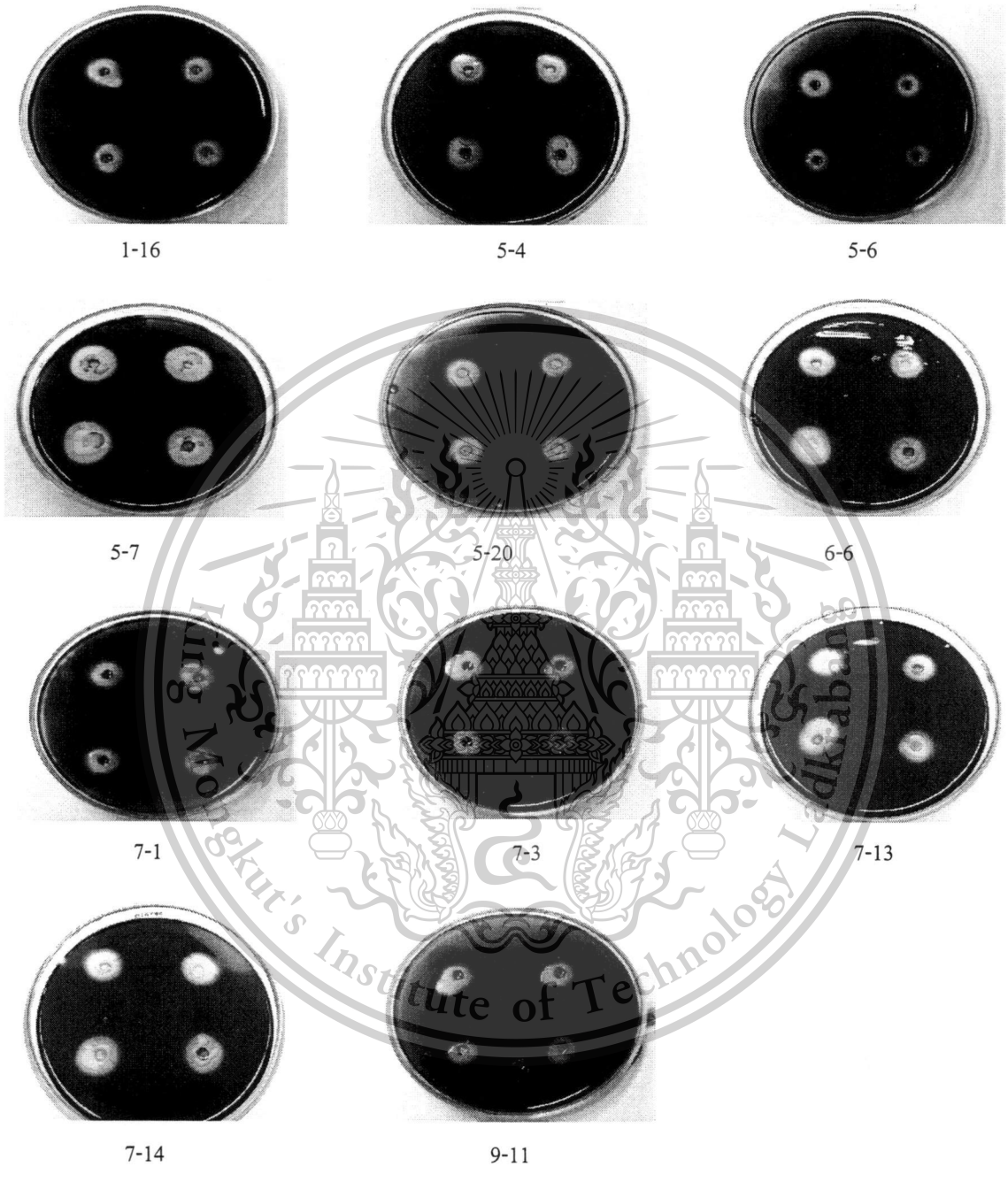
ตารางที่ 4.2 การจัดกลุ่มตามค่า hydrolysis capacity (HC) ของเชื้อที่พบการเกิดโซนใสรอบโคโลนีบนอาหาร starch agar ที่ทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน จำนวน 103 ไอโซเลท

กลุ่ม	ค่า HC	ไอโซเลท	รวม (ไอโซเลท)
1	มากกว่า 2	1-16, 5-4, 5-6, 5-7, 5-20, 6-6, 7-1, 7-3, 7-13, 7-14, 9-11	11
2	1.50-1.99	1-1, 1-2, 1-5, 1-15, 1-18, 2-3, 2-6, 2-17, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11, 3-12, 3-18, 4-4, 4-5, 4-8, 4-14, 4-17, 5-5, 5-8, 5-11, 5-12, 5-13, 5-14, 5-15, 5-16, 5-17, 6-1, 6-5, 6-11, 6-13, 6-16, 6-18, 6-20, 7-2, 7-4, 7-6, 7-7, 7-8, 7-11, 7-15, 7-16, 7-18, 8-3, 9-4, 9-5, 9-6, 9-7, 9-10, 9-12, 9-16, 9-17	54
3	1.00-1.44	1-6, 1-8, 1-12, 2-5, 2-11, 2-14, 2-15, 2-16, 2-18, 3-5, 3-19, 4-1, 4-10, 5-1, 5-2, 5-3, 5-10, 5-19, 7-9, 7-21, 8-1, 8-2, 8-5, 8-6, 8-7, 8-9, 8-10, 8-11, 8-15, 8-16, 8-19, 9-3, 9-8, 9-9, 9-13, 9-14, 9-15	38

จากการทดสอบเบื้องต้นได้เชื้อที่มีค่า HC สูงสุด จำนวน 11 ไอโซเลต นำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเพื่อยืนยันผล โดยควบคุมปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ OD 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.4 และทดสอบการย่อยแป้งของเชื้อบนอาหาร starch agar ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร และหยดเชื้อลงในหลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการททับด้วยสารละลายไอโอดีน พบการสร้างโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อทุกไอโซเลทที่ทำการทดสอบ ดังภาพที่ 4.1 ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส เพื่อคำนวณหาค่า HC พบว่ามีค่า HC อยู่ในช่วง 1.19-1.58 ดังตารางที่ 4.3

ผลการทดลองพบว่า เมื่อนำเชื้อมาทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งบนอาหาร starch agar เพื่อยืนยันผล ค่า HC ที่ได้มีน้อยกว่าการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น เป็นผลมาจากการควบคุมปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการทดสอบ และระยะเวลาที่ใช้ในการทำบ่มเชื้อลดลง ทำให้ค่า HC ลดลงตามไปด้วย ซึ่งค่า HC ที่ได้นี้ สามารถนำไปเปรียบเทียบ เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีความเหมาะสมในการย่อยแป้งต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



ภาพที่ 4.1 ลักษณะการเกิดโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อบนอาหาร starch agar ที่ทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 4.3 ค่า hydrolysis capacity (HC) ของเชื้อ จำนวน 11 ไอโซเลท บนอาหาร starch agar

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส รอบโคโลนี (เซนติเมตร)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)	ค่า HC
1-16	1.19±0.05	0.86±0.04	1.38±0.12 ^{bc}
5-4	1.31±0.09	0.98±0.00	1.34±0.10 ^{bcd}
5-6	1.17±0.04	0.95±0.01	1.23±0.03 ^{bcd}
5-7	1.55±0.24	0.98±0.09	1.58±0.14 ^{a}
5-20	1.27±0.08	0.91±0.07	1.40±0.09 ^{ab}
6-6	1.29±0.06	1.04±0.05	1.23±0.11 ^{bcde}
7-1	1.24±0.10	0.95±0.06	1.30±0.03 ^{bcd}
7-3	1.29±0.04	1.06±0.12	1.21±0.13 ^{bcde}
7-13	1.14±0.13	0.94±0.08	1.21±0.04 ^{cde}
7-14	1.24±0.13	0.91±0.06	1.35±0.15 ^{bcd}
9-11	1.23±0.13	1.04±0.06	1.19±0.06 ^{de}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันหมายถึง ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

$$\text{Hydrolysis capacity (HC)} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสรอบโคโลนี (เซนติเมตร)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)}}$$

4.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อที่แยกได้

4.3.1 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2 จำนวน 11 ไอโซเลท ในอาหาร NB ทำการเตรียมสารสกัดเอนไซม์ และทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (soluble starch) ด้วยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และหาปริมาณโปรตีน พบว่าค่าการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส (enzyme activity) อยู่ในช่วง 1.95-3.61 U/ml และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (specific activity) ในช่วง 93.74-399.10 U/mg ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส พบว่าไอโซเลทที่ 5-20, 5-4 และ 6-6 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 399.10, 318.80 และ 346.20 U/mg ซึ่งสูงกว่าไอโซเลทอื่นๆ ดังตารางที่ 4.4

4.3.2 ความสามารถในการย่อยแป้งของเอนไซม์อะไมเลส

นำสารสกัดเอนไซม์จากเชื้อ จำนวน 11 ไอโซเลท มาทดสอบการย่อยแป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด และแป้งข้าวจ้าว แทนการย่อย soluble starch ด้วยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และหาปริมาณโปรตีน พบว่าไอโซเลทที่แยกได้ทุกชนิดมีความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง แป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 4.4 กิจกรรรมเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อแต่ละไอโซเลท

ไอโซเลท	Enzyme activity (U/ml)	Specific activity (U/mg protein)
1-16	2.45	133.35
5-4	3.61	318.80
5-6	1.95	151.19
5-7	2.20	189.97
5-20	3.01	399.10
6-6	3.12	346.20
7-1	2.22	272.40
7-3	2.68	117.51
7-13	2.62	105.03
7-14	1.98	93.74
9-11	2.84	111.37

ข้าวโพด และแป้งข้าวจ้าวได้ โดยแป้งมันสำปะหลัง พบว่าไอโซเลท 5-20 มีค่ากิจกรรมของย่อยแป้งสูงสุด เท่ากับ 181.49 U/mg รองลงมาคือ ไอโซเลท 7-1 และ 6-6 มีค่ากิจกรรมของย่อยแป้ง 166.89 และ 154.08 U/mg การย่อยแป้งข้าวโพดพบว่าไอโซเลท 5-20 มีค่ากิจกรรมของย่อยแป้งสูงสุด เท่ากับ 209.57 U/mg รองลงมาคือ ไอโซเลท 6-6 และ 7-1 มีค่ากิจกรรมของย่อยแป้ง 185.82 และ 178.24 U/mg ตามลำดับ ส่วนการย่อยแป้งข้าวเจ้า พบว่าไอโซเลท 5-7 มีค่ากิจกรรมของย่อยแป้งข้าวเจ้าสูงสุด เท่ากับ 197.99 U/mg รองลงมาคือ ไอโซเลท 6-6 และ 5-20 มีค่ากิจกรรมของย่อยแป้ง 174.17 และ 169.40 U/mg ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่แยกได้มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ทุกชนิดแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแตกต่างกัน และสัดส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินในแป้งมีผลต่อการย่อยของเอนไซม์อะไมเลส

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ไอโซเลท 5-20, 6-6 และ 7-1 พบมีค่ากิจกรรมของย่อยแป้ง soluble starch แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด และแป้งข้าวจ้าวได้สูงสุดในอันดับต้นๆ ดังนั้นจึงน่าสนใจนำไปจำแนกและระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 4.5 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากการย่อยแป้งต่างๆ ของเชื้อแต่ละไอโซเลท

ไอโซเลท	แป้งมันสำปะหลัง		แป้งข้าวโพด		แป้งข้าวจ้าว	
	Enzyme activity (U/ml)	**Specific activity (U/mg protein)**	**Enzyme activity (U/ml)**	**Specific activity (U/mg protein)**	**Enzyme activity (U/ml)**	**Specific activity (U/mg protein)**
1-16	1.33	72.69	1.44	78.64	1.36	73.77
5-4	1.34	118.95	1.91	170.93	1.57	139.21
5-6	1.34	105.86	1.33	104.49	1.37	107.83
5-7	1.36	115.83	1.40	120.64	1.38	197.99
5-20	1.35	181.49	1.58	209.57	1.51	169.40
6-6	1.39	154.08	1.67	185.82	1.53	174.17
7-1	1.37	166.89	1.46	178.24	1.43	59.81
7-3	1.35	59.36	1.42	62.58	1.36	57.98
7-13	1.34	53.65	1.52	61.13	1.45	63.96
7-14	1.32	62.37	1.39	65.47	1.36	58.77
9-11	1.40	55.38	1.64	64.29	1.50	68.01

4.3.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

นำไอโซเลท 5-20, 6-6 และ 7-1 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมแกรม และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าทุกไอโซเลท มีลักษณะเซลล์เป็นรูปท่อน ติดสีแกรมบวก เมื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ดังตารางที่ 4.6 สามารถจำแนกระบุสายพันธุ์แบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% Identities) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA พบว่าไอโซเลท 5-20, 6-6 และ 7-1 มีความเหมือนกับเชื้อ *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* str. H9401 และ *Bacillus cereus* strain ch2 มีค่าเปอร์เซนต์ความเหมือน 99% ตามลำดับ ซึ่งเชื้อในสกุล *Bacillus* มักพบได้ทั่วไปในธัญพืช และผลิตภัณฑ์ (สุมาลี เหลืองสกุล, 2539) Inatsu et al. (2006) รายงานว่าได้แยกเชื้อ *B. subtilis* จากถั่วเน่าอาหารหมัก ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลสได้ และ Amoa-Awua et al. (2005) ได้ทำการแยกเชื้อ *B. subtilis* จำนวน 42 ไอโซเลท จากถั่วเหลืองหมัก dawadawa ที่พบมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสบน starch agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

ไอโซเลท	ลักษณะของรูปร่างของเซลล์	รายละเอียดของยีน	หมายเลขยีน	ค่าความเหมือน (Identities)
5-20	รูปท่อน ติดสีแกรมบวก	*Bacillus* sp. 313SI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ734551.1	99%
		Bacillus sp. 311SI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ734549.1	99%
		Bacillus cereus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ518346.1	99%
6-6	รูปท่อน ติดสีแกรมบวก	Uncultured bacterium clone SN231 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ825117.1	99%
		Bacillus anthracis str. H9401, complete genome	CP002091.1	99%
		Bacillus anthracis strain FCC158 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	F772102.1	99%
7-1	รูปท่อน ติดสีแกรมบวก	Bacterium Te27R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY587813.1	99%
		Bacillus cereus strain ch2 16S ribosomal RNA gene, partial	DQ122123.1	99%
		sequence *Bacillus cereus* partial 16S rRNA gene, strain TMW 2.383	AJ809498.1	99%

จากการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อโดยอาศัยยีน 16s rRNA พบว่าเป็นเชื้อ *B. cereus* และ *B. anthracis* มีรายงานว่า *B. cereus* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษ หากนำเชื้อนี้มาใช้ในการผลิตเอนไซม์อาจเป็นอันตรายได้ ดังนั้นการนำเชื้อเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์อาจใช้การ โคลนยีนอะไมเลสจากเชื้อ และศึกษาการแสดงออกของยีนในยีสต์ เพื่อให้ยีสต์สามารถย่อยแป้งได้ และยีสต์สามารถนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่าทั้งหมด 9 ตัวอย่างที่ได้จาก อ.เมือง และ อ.สูงเม่น จังหวัดแพร่ และอ.สารภี จังหวัดเชียงใหม่ บนอาหาร starch agar พบว่ามีเชื้อทั้งหมด 103 ไอโซเลทที่สามารถในการย่อยแป้งได้ คัดเลือกเชื้อที่เกิดโซนใสสูงสุด จำนวน 11 ไอโซเลท คือไอโซเลท 1-16, 5-4, 5-6, 5-7, 5-20, 6-6, 7-1, 7-3, 7-13, 7-14 และ 9-11 ตามลำดับ จากนั้นนำมาหาค่า hydrolysis capacity (HC) ของเชื้อบนอาหาร starch agar พบว่ามีค่า HC อยู่ในช่วง 1.19-1.58

5.1.2 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของ 11 ไอโซเลท พบว่าค่าการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส (enzyme activity) อยู่ในช่วง 1.95-3.61 U/ml และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (specific activity) ในช่วง 93.74-399.10 U/mg จากนั้นทดสอบการย่อยแป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด และแป้งข้าวจ้าว แทนการย่อย soluble starch พบว่าไอโซเลท 5-20 มีค่ากิจกรรมของย่อยแป้งสูงสุด เท่ากับ 181.49 U/mg รองลงมาคือ ไอโซเลท 7-1 และ 6-6 มีค่ากิจกรรมของย่อยแป้ง 166.89 และ 154.08 U/mg การย่อยแป้งข้าวโพดพบว่าไอโซเลท 5-20 มีค่ากิจกรรมของย่อยแป้งสูงสุด เท่ากับ 209.57 U/mg รองลงมาคือ ไอโซเลท 6-6 และ 7-1 มีค่ากิจกรรมของย่อยแป้ง 185.82 และ 178.24 U/mg ตามลำดับ ส่วนการย่อยแป้งข้าวเจ้า พบว่าไอโซเลท 5-7 มีค่ากิจกรรมของย่อยแป้งข้าวเจ้าสูงสุด เท่ากับ 197.99 U/mg รองลงมาคือ ไอโซเลท 6-6 และ 5-20 มีค่ากิจกรรมของย่อยแป้ง 174.17 และ 169.40 U/mg ตามลำดับ และเชื้อที่แยกได้มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ทุกชนิดได้แตกต่างกัน

5.1.3 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของไอโซเลท 5-20, 6-6 และ 7-1 พบว่า มีลักษณะเป็นท่อนต่อกันเป็นสายและติดสีแกรมบวก จากการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อโดยอาศัยยีน 16s rRNA พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus cereus* และ *B. anthracis* และ *B cereus* ตามลำดับ

5.1.2 ข้อเสนอแนะ

เชื้อที่แยกได้ พบในสกุล *Bacillus* ซึ่ง *B. cereus* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษ หากนำมาผลิตเอนไซม์อาจเป็นอันตรายได้ ดังนั้นอาจใช้การโคลนยีนอะไมเลสจากเชื้อนี้ และศึกษาการแสดงออกของยีนในยีสต์ เพื่อให้ยีสต์สามารถย่อยแป้งได้และใช้ในการผลิตเอทานอลต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

เอกสารอ้างอิง

นภา โล่ทอง. 2552. คู่มือปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ

ศรีจันทรัตน์ กันทะวัง. 2551. 1 มิถุนายน. "ถั่วเน่า". มติชนรายวัน. หน้า 10.

วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ

Amoa-Awua, W.K, N.N. Terlabie and E.Sakyi-Dawson 2005. Screening of 42 *Bacillus* isolates of ability to ferment soybean into dawadawa. Food Microbiology. 106:343-347.

Asgher, M., M. Javaid Asad, S.U. Rahman, R.L. Legge. 2007. A thermostable a-amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. Journal of Food Engineering 79: 950–955.

Chantawannakul, P., A. Oncharoan, K. Klanbut, E. Chukeatirote and S. Lumyong. 2002. Characterization of protease of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. Science Asia. 28:241–245.

Inatsu, Y., N. Nakamura, Y. Yuriko, T. Fushimi, L. Watanasiritum and S. Kawamoto. 2006. Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao,a traditional fermented soybean food in northern Thailand. Letters in Applied. Microbiology. 43: 237-242.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ภาคผนวก ก
การตรวจวิเคราะห์

1. การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Nutrient agar

- Beef extract	3	กรัม
- Peptone	5	กรัม
- Agar	15	กรัม
- น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม Nutreint agar (NA)

1. ชั่งสารดังนี้ beef extract 3 กรัม peptone 5 กรัม และ agar 15 กรัม
2. ผสมให้เข้ากัน นำไปละลายโดยให้ความร้อน ปรับปริมาตร ให้เป็น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 30 นาที

1.2 Nutrient broth (NB)

- Beef extract	3	กรัม
- Peptone	5	กรัม
- น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม Nutreint agar (NB)

1. ชั่งสารดังนี้ beef extract 3 กรัม และ peptone 5 กรัม
2. ผสมให้เข้ากัน นำไปละลายโดยให้ความร้อน ปรับปริมาตร ให้เป็น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 30 นาที

1.3 Starch agar

- Beef extract	3	กรัม
- Peptone	5	กรัม
- Agar	15	กรัม
- Starch	23	กรัม
- น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

วิธีเตรียม starch agar

1. เตรียม NA 23 กรัม เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน
2. ชั่ง Starch 10 กรัม นำไปละลายโดยให้ความร้อนและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 มิลลิลิตร
3. จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 30 นาที

1.4 Iodine solution (Lugol's for Gram staining)

- Iodine	1	กรัม
- Potassium iodide (KI)	2	กรัม
- น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม Iodine solution

1. ผสมสาระลายทั้งสองชนิดแล้วค่อยๆเติมน้ำทีละน้อยจนกระทั่ง iodine ละลายหมด
2. เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 300 มิลลิลิตร

1.5 Acetate buffer (pH 5)

- 0.1 M acetic acid	357	มิลลิลิตร
- 0.1 M sodium acetate	643	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม Acetate buffer

1. เตรียม 0.1 M sodium acetate โดยชั่ง sodium acetate 6 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
2. เตรียม 0.1 M acetic acid โดยชั่ง acetic acid 13.6 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
3. ตวง acetic acid ปริมาตร 357 มิลลิลิตร และ sodium acetate ปริมาตร 643 มิลลิลิตร
4. ทำการผสมสารละลายทั้งสองให้เข้ากัน และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

2. การตรวจวิเคราะห์ทางเคมี

2.1 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (dinitrosalicylic method)

สารเคมี

- 3,5-dinitrosalicylic acid	10.6	กรัม
- NaOH	19.8	กรัม
- Potassium sodium tartate	306	กรัม
- $Na_2S_2O_5$	8.3	กรัม
- Phenol	7.6	กรัม
- น้ำกลั่น	2000	มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมี DNS reagent

1. ชั่งสารดังนี้ $Na_2S_2O_5$ 8.3 กรัม, NaOH 19.8, กรัม Potassium sodium tartate 306 กรัม, 3,5-dinitrosalicylic acid 10.6 กรัม และ Phenol 7.6 กรัม
2. ละลายสารลงในน้ำอุ่น

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายกลูโคส (5.0 ไมโครโมล/มิลลิลิตร) ปิเปต 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ1.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นโดยให้ปริมาตรในแต่ละหลอดเป็น 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม DNS reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร แช่หลอดทดลองน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำเย็นทันที เมื่อถึงอุณหภูมิห้องแล้วให้เติมน้ำกลั่นลงไป หลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยหลอดเปรียบเทียบ (blank) ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายกลูโคสเขียนกราฟระหว่างค่าที่อ่านได้กับปริมาณกลูโคสในแต่ละหลอด

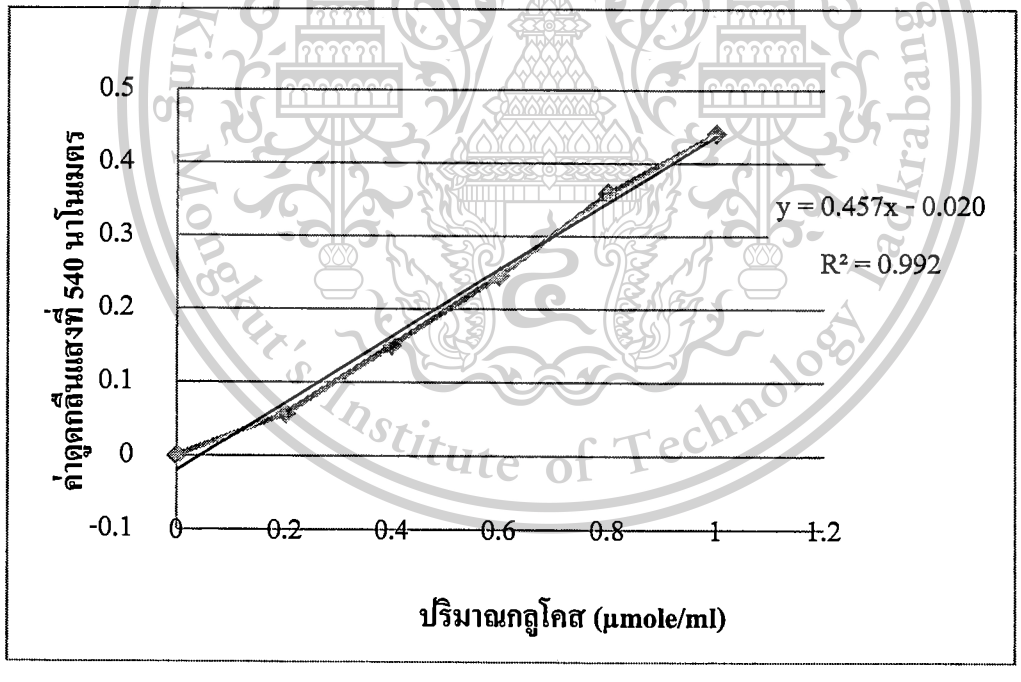
2. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดเติม DNS reagent 1 มิลลิลิตร แช่หลอดทดลองในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำเย็นทันที เมื่อถึงอุณหภูมิห้องแล้วให้เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางภาคผนวกที่ ก1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร กับสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ

ปริมาณกลูโคส (µ mole)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร			เฉลี่ย
	1	2	3	
0	0	0	0	0
0.2	0.062	0.053	0.058	0.057
0.4	0.154	0.142	0.155	0.150
0.6	0.24	0.244	0.253	0.245
0.8	0.354	0.368	0.355	0.359
1	0.459	0.418	0.444	0.440



ภาพภาคผนวกที่ ก1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร กับปริมาณกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford

สารเคมี

- Bovine serum albumin (BSA)

การเตรียมสารเคมี DNS reagent

ชั่ง BSA 10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิตร จะได้ BSA 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย BSA 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสาร BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 0.02 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Bradford หลอดละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลาย BSA เขียนกราฟระหว่างค่าที่อ่านได้กับปริมาณโปรตีนในแต่ละหลอด

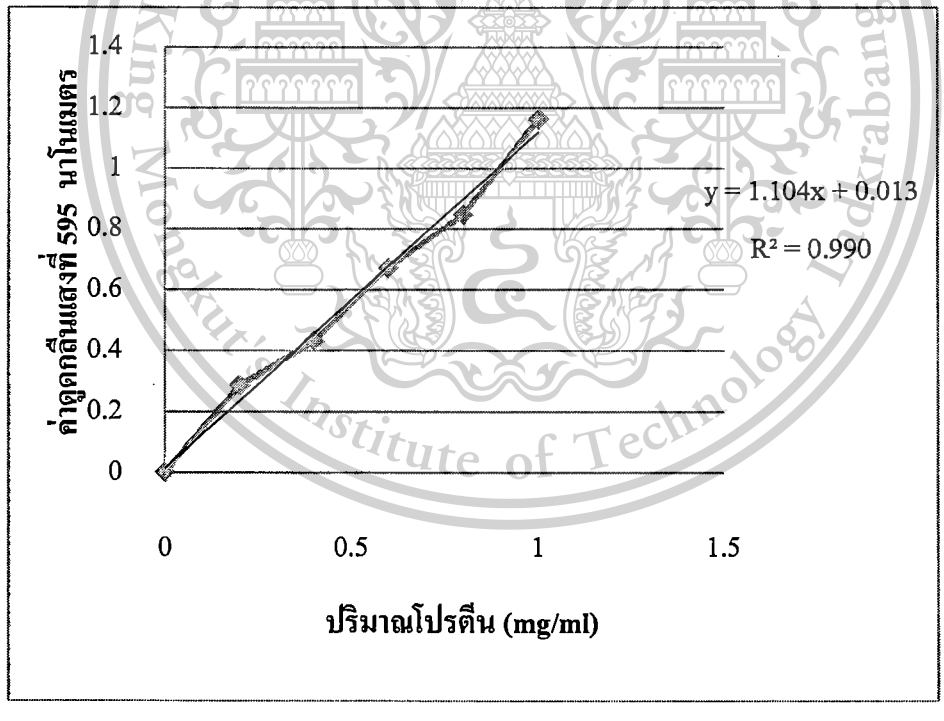
2. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปิเปตสารสกัดเอนไซม์ที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NB ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ลงใน 1 มิลลิลิตรของสารละลาย Bradford ลงในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดเอนไซม์ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยเทียบค่า BSA จากกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางภาคผนวกที่ ก2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร กับปริมาณโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

BSA (mg/ml)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร			เฉลี่ย
	1	2	3	
0	0	0	0	0
0.2	0.279	0.290	0.289	0.286
0.4	0.435	0.428	0.427	0.430
0.6	0.681	0.675	0.66	0.672
0.8	0.85	0.845	0.843	0.846
1	1.159	1.168	1.162	1.163



ภาพภาคผนวกที่ ก2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 595 กับ ปริมาณโปรตีน (mg/ml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

3. การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

3.1 การย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) (นภา โล่ห์ทอง, 2525)

1. ทำเครื่องหมายวงกลมบริเวณที่จะสเมียร์หลังสไลด์
2. ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแตะน้ำ 1-2 ลูป ลงบนสไลด์
3. จุ่มเชื้อ 2-3 ลูปจากอาหารเหลว แตะลงบนสไลด์
4. เขี่ยเชื้อเพียงเล็กน้อย แตะลงบนหยดน้ำ แล้วแผ่กระจายเชื้อให้ทั่วในหยดน้ำบริเวณที่ทำเครื่องหมาย
5. ทิ้งให้รอยสเมียร์แห้งเอง แล้วจึงทำการฟิกซ์รอยสเมียร์ โดยการลนผ่านเปลวไฟอ่อนๆ 2-3 ครั้ง
6. หยดสี crytal violet ลงบนรอยสเมียร์ให้ท่วม ทิ้งไว้นาน 1 นาที และล้างสีออกด้วยน้ำที่ไหลเบาๆ
7. หยด iodine ของแกรมให้ท่วม รอยสเมียร์
8. ล้าง iodine ออกด้วยแอลกอฮอล์ 15 วินาที และล้างออกด้วยน้ำที่ไหลเบาๆ
9. ย้อมทับสีด้วย safranin นาน 1 นาที และล้างสีออกด้วยน้ำที่ไหลเบาๆแล้วซับให้แห้ง

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ภาคผนวก ข
สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ทะเบียนคุมโครงการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2556

งานวิจัย พัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยี (0401)

เรื่อง : การคัดเลือกแบคทีเรียจากถั่วเน่าที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการย่อยแป้ง

ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

ลำดับ	รายการ	เลขที่	วัน เดือน ปี	ยอดอนุมัติ	ค่าจ้างชั่วคราว	ค่าตอบแทน	ค่าใช้สอย	ค่าวัสดุ	ค่าครุภัณฑ์	ศธ	วันเบิก	จำนวนเงิน	หมายเหตุ
							15,000.00	65,000.00					80,000.00
1	ค่าสังเคราะห์ Primer	1-56	22 ม.ค.56	6,676.80			6,676.80			069	8 มี.ค.56	6,420.00	อ.อพัชชา
2	Bottle Lab W/Screw-Cap...	2-56	22 ม.ค.56	1,690.60				1,690.60		040	12 ก.พ.56	1,690.60	อ.อพัชชา
3	Pyridoxal 5 phosphate,...	3-56	22 ม.ค.56	12,733.00				12,733.00		073	13 มี.ค.56	12,733.00	อ.อพัชชา
4	Deansyl Chloride,...	9-56	11 ก.พ.56	6,559.10				6,559.10		128	19 เม.ย.56	6,559.10	อ.อพัชชา
5	ค่าวิเคราะห์ 16srRNA...	10-56	11 ก.พ.56	8,774.02			8,774.02			129	19 เม.ย.56	8,774.02	อ.อพัชชา
6	ค่าวิเคราะห์ 16srRNA	8-56	11 ก.พ.56	9,405.30			9,405.30			138	2 พ.ค.56	9,405.30	อ.อพัชชา
7	Tag DNA Polymerase,...	22-56	19 มี.ค.56	12,947.00				12,947.00		251	19 ก.ค.56	12,947.00	อ.อพัชชา
8	HDEXT	52-56	25 มิ.ย.56	2,250.00				2,250.00		233	5 ก.ค.56	2,250.00	อ.อพัชชา
9	ถุงมือแพทย์,ถุงมือแพทย์,...	53-56	25 มิ.ย.56	3,103.00				3,103.00		338	20 ก.ย.56	3,103.00	อ.อพัชชา
10	น้ำยาล้างจาน,กระดาษ...	54-56	27 มิ.ย.56	394.00				394.00		233	5 ก.ค.56	394.00	อ.อพัชชา
11	Ethyl alcohol,Petri...	55-56	27 มิ.ย.56	2,621.50				2,621.50		339	20 ก.ย.56	2,621.50	อ.อพัชชา
12	ค่าวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	59-56	1 ก.ค.56	9,630.00			9,630.00			337	20 ก.ย.56	9,630.00	อ.อพัชชา
13	ค่าตรวจหา Salmonella	60-56	2 ก.ค.56	200.00			200.00			332	20 ก.ย.56	200.00	อ.อพัชชา
14	Pipette Tip,Tip Universal...	64-56	29 ก.ค.56	2,862.25				2,862.25		333	20 ก.ย.56	2,805.01	อ.อพัชชา
15	กระดาษเอนกประสงค์,...	105-56	13 ก.ย.56	447.00				447.00		333	20 ก.ย.56	447.00	อ.อพัชชา
				80,293.57		-	34,686.12	45,607.45				79,979.53	
				- 293.57		-	- 19,686.12	19,392.55				20.47	

This material is reserved for educational purposes only. Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ประวัตินักวิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ

เพศ ☐ ชาย √ หญิง

สถานภาพ ☐ โสด √ สมรส

ตำแหน่งปัจจุบัน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

ประวัติการศึกษา

ชื่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต	เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2551
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคโนโลยีทางชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2537
วิทยาศาสตรบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2534

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

- เทคโนโลยีชีวภาพผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
- จุลชีววิทยาและความปลอดภัยทางอาหาร
- การประยุกต์ใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร

ทุนวิจัยที่เคยได้รับ : ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา

เริ่มปี พ.ศ.	เสร็จปี พ.ศ.	ชื่อผลงาน/โครงการ (สถานภาพในการทำการวิจัย)	แหล่งทุน
2555	2556	การคัดเลือกแบคทีเรียจากถั่วเน่าที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการย่อยแป้ง (หัวหน้าโครงการวิจัย)	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2555	2556	การตรวจและการจำแนกเชื้อ *Salmonella* Enteritidis, *S.* Anatum, *S.* Derby และ *S.* Ratchaburi ในระดับซีโรวาร์ที่พบในอาหารโดยใช้วิธีพีซีอาร์ (หัวหน้าโครงการวิจัย)	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

เริ่มปี พ.ศ.	เสร็จปี พ.ศ.	ชื่อผลงาน/โครงการ (สถานภาพในการทำการวิจัย)	แหล่งทุน
2554	2555	ผลของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการควบคุมการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลา ในระหว่างการหมักหม้ำ (หัวหน้าโครงการวิจัย)	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2554	2555	ประสิทธิภาพของน้ำส้มสายชูกลั่นในการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* Ratchaburi ในโหระพา (หัวหน้าโครงการวิจัย)	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2554	2555	การสำรวจคุณภาพและความปลอดภัยของหม้ำในจังหวัดชัยภูมิ (ผู้ร่วมวิจัย)	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
2553	2554	การผลิตสบู่เหลวและสบู่ก้อนผสมสารสกัดจากแห้วจีน (หัวหน้าโครงการวิจัย)	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2552	2553	การวิเคราะห์แบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักและเก็บรักษาไส้กรอกอีสานโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (หัวหน้าโครงการวิจัย)	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2552	2553	การพัฒนาระบบการจัดการและควบคุมสุขลักษณะที่ดีในโรงอาหารของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (ผู้ร่วมวิจัย)	งบประมาณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2551	2552	การพัฒนาวิธีพีซีอาร์ในการตรวจสอบแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อของไทย (หัวหน้าโครงการวิจัย)	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.

ผลงานวิจัยและการเสนอผลงานวิชาการ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ (จำแนกระดับชาติและระดับนานาชาติหรือเทียบเท่า)

- **Jindaprasert, A.,** Tomanit, S., Swetwiwathana, A. and Chuen-Im Ahmed, S. 2011. Effect of probiotic and temperature on survival of *Escherichia coli* 0157:H7 during storage of probiotic set yoghurt. King Mongkuts Agricultural Journal. 29 (3-1): 67-75. (in Thai)
- **Jindaprasert, A.,** Samappito, S., Springob, K., Schmidt, J., Gulder, T., De-Eknamkul, W., Bringman, G. and Kutchan, T.M. 2010. *In vitro* plants, callus and root cultures of *Plumbago indica* and their biosynthetic potential for plumbagin. King Mongkut's Agro-Industry Journal. 2 (1): 53-65.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- Rinthong, P., **Jindaprasert, A.** and De-Eknamkul, W. 2009. Simple Densitometric TLC Analysis of Plaunotol for Screening of High-Plaunotol-Containing Plants of *Croton stellatopilosus* Ohba. Journal of Planar Chromatography 22 (1): 55-58.
- **Jindaprasert, A.**, Springob, K., Schmidt, J., De-Eknamkul, W. and Kutchan, T.M. 2008. Pyrone polyketides synthesized by a type III polyketide synthase from *Drosophyllum lusitanicum*. Phytochemistry 69: 3043–3053.
- Springob, K., Samappito, S., **Jindaprasert, A.**, Schmidt, J., Page, J.E., De-Eknamkul, W. and Kutchan, T.M., 2007. A polyketide synthase of *Plumbago indica* that catalyzes the formation of hexaketide pyrones. FEBS Journal. 274 : 406-417.
- **Jindaprasert, A.** 2000. Plaun-Noi: Thai medicinal plant for peptic ulcer treatment. King Mongkut's Agricultural Journal. 18 (3): 69-72. (in Thai)
- **Vongcharoensathit, A.** and De-Eknamkul, W. 1998. Rapid TLC-densitometric analysis of plaunotol from *Croton sublyratus* leaves. Planta Medica. 64 (3): 279-280.

2. ผลงานที่ได้รับการนำเสนอผลงานในที่ประชุม (จำแนกระดับชาติและระดับนานาชาติหรือเทียบเท่า) : ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา

- **Jindaprasert, A.**, Jirajaroenrat, K. and Swetwiwathana, A. 2012. Microbial community during Thai traditional fermented sausage (Isan sausage) fermentation. The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, November 29-30th, 2012, Sunee Grand Hotel and Convention Center, Ubon Ratchatani, Thailand. pp. 549-551.
- Morklang, M. and **Jindaprasert, A.** 2012. Effects of distilled vinegar, potassium permanganate and sodium bicarbonate on reduction of *Salmonella* Typhimurium *in vitro*. The Proceeding of 1st KMITL Agro-Industry Conference, September 7th, 2012. The Emerald Hotel, Bangkok, Thailand. pp. 89-93 (in Thai).
- Inwimol, T., **Jindaprasert, A.** and Swetwiwathana, A. 2012. The study of growth, lactic acid and bacteriocin production of *Pediococcus pentosaceus* M13 in MRS broth. The Proceeding of 1st KMITL Agro-Industry Conference, September 7th, 2012. The Emerald Hotel, Bangkok, Thailand. pp. 467-473 (in Thai).
- Limsombun, T., Nakrin, C., Banjong, K., **Jindaprasert, A.** and Swetwiwathana. A. 2012. Hygienic situation of mum processing plants in Chaiyaphum province under Thai GMP. Proceedings of 50th Kasetsart University Annual Conference: Agro-Industry. January 31st - February 2nd, 2012, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. pp 287-294 (in Thai).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- **Jindaprasert, A.**, Jirajaroenrat, K. and Swetwiwathana, A. 2011. Characterization of lactic acid bacteria in Thai traditional fermented sausage during fermentation and storage. The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 29th -31st, 2011, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. Fer1 P9, 7 pages.
- Booppata, M., **Jindaprasert, A.**, Jirajaroenrat, K. and Srikijkasemwat, K. 2011. Selection of cellulose and xylanase producing bacteria from buffalo rumen. The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 29th - 31st, 2011, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. Fer4 P34, 7 pages.
- Thaenkudrun, P., **Jindaprasert, A.** and Jirajaroenrat, K. 2011. Cloning of a cellulase gene from *Bacillus* sp. and expression in *Escherichia coli*. The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 29th -31st, 2011, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. Fer4 P15, 6 pages.
- Siraprapapat, P., **Jindaprasert, A.** and Jirajaroenrat, K. 2011. Expression and secretion of heterologous alpha-amylase in yeast *Kluyveromyces lactis*. The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 29th -31st, 2011, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. Fer4 P33, 6 pages.
- Srichareon, D., **Jindaprasert, A.**, Swetwiwathana, A. and Banjong, K. 2011. Study on mold contamination in a pasteurized milk filling process. Burapha University National Conference 2011, July 6-7th, 2011. Burapha University, Chonburi, Thailand. 10 pages (in Thai).
- Chantanayingyong, K., **Jindaprasert, A.**, Banjong, K., Swetwiwathana, A. and Krusong, W. 2011. Effects of distilled vinegar on *Salmonella* Bangkok, *Salmonella* Ratchaburi and *Salmonella* Lamphun reduction *in vitro*. STDC 2011, June 30th – July 1st, 2011, Faculty of Science and Technology, Thammasart University (Rangsit Campus). pp 248-255 (in Thai).
- Veerawatanayotin, S., **Jindaprasert, A.**, Pilasombut, K., Sethakul, J. and Swetwiwathana, A. 2010. Effect of pediocin PA-1, pH and nitrite on *Salmonella* Anatum and S. Ratchaburi in simulated Nham (traditional Thai fermented meat sausage) model broth. Proceeding 56th International Congress of Meat Science and Technology (ICOMST 2010), August 15-20th, 2010, Jeju, Korea. 4 pages.
- Pawkratok, N., **Jindaprasert, A.**, Pilasombut, K., Sethakul, J. and Swetwiwathana, A. 2010. Effect of bacteriocin-producing *Weissella cibaria* SI21 and *Lactobacillus plantarum* RS49 on *Staphylococcus aureus* in Isan sausage (traditional Thai fermented mea-rice sausage) model

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

broth. Proceeding 56th International Congress of Meat Science and Technology (ICOMST 2010), August 15-20th, 2010, Jeju, Korea. 4 pages.

- Saisawart, P., **Jindaprasert, A.**, Krusong, W. and Swetwiwathana, A. 2010. Effect of chitosan on associated bacterial pathogen in Nham (traditional Thai fermented meat sausage) model broth. Proceeding 56th International Congress of Meat Science and Technology (ICOMST 2010), August 15-20th, 2010, Jeju, Korea. 3 pages.
- Tomanit, S., **Jindaprasert, A.**, Swetwiwathana, A., Chuen-Im Ahmed, S. 2010. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the production and storage of probiotic set yoghurt. STDC 2010, March, 19th, 2010, Faculty of Science and Technology, Thammasart University (Rangsit Campus). 6 pages (in Thai).
- Namwong, C., **Jindaprasert, A.**, Swetwiwathana, A. and Chuen-Im Ahmed, S. Factors affecting microbial contamination in the production of set-type yoghurt. The 11th Graduate Research Conference Khon Kaen University. February 12th, 2010, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. pp 898-906 (in Thai).
- Intree, S., **Jindaprasert, A.**, Nitisinprasert, S. and Swetwiwathana, A. 2010. Identification of wild yeast contaminants in lager brewing process. Proceedings of 48th Kasetsart University Annual Conference: Agro-Industry. February 3rd -5th, 2010, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. pp 287-294 (in Thai).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.