ประสิทธิภาพของไนซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ในน้ำอ้อย

EFFECT OF NISIN ON *Streptococcus mutans* IN SUGARCANE JUICE

พีรดา ลายลักษณ์
วิภาดา ดอนฮี้
ศิริฉัตร หอมสวัสดิ์

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ประสิทธิภาพของไนซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ในน้ำอ้อย

EFFECT OF NISIN ON *Streptococcus mutans* IN SUGARCANE JUICE

จัดทำโดย

พีรดา ลายลักษณ์ รหัสนักศึกษา 58080123

วิภาดา ดอนยี้ รหัสนักศึกษา 58080135

ศิริฉัตร หอมสวัสดิ์ รหัสนักศึกษา 58080138

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

15 / ก.ค. / 62

(รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	ประสิทธิภาพของไนซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ในน้ำอ้อย
ชื่อนักศึกษา	พีรดา ลายลักษณ์ รหัสนักศึกษา 58080123วิภาดา ดอนฮี้ รหัสนักศึกษา 58080135 ศิริฉัตร หอมสวัสดิ์ รหัสนักศึกษา 58080138
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพแบคเทอริโอซินในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาน้ำอ้อยและเปรียบเทียบความคุ้มทุนเมื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรม จากการศึกษาพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในน้ำอ้อยมากที่สุดและเป็นสาเหตุที่ทำให้น้ำอ้อยเสื่อมเสีย คือ แบคทีเรียแลคติก ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของ *Lactobacillus* spp. โดยเชื้อที่มีผลต่อการเสื่อมเสียของน้ำอ้อยมากที่สุดคือ *Lb. sakei* และเพื่อเพิ่มคุณประโยชน์ของไนซินที่เติมในน้ำอ้อย จึงทำการศึกษาผลของไนซินต่อเชื้อที่อาจพบในน้ำอ้อยและเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดฟันผุ ได้แก่ *Streptococcus mutans* และเลือกใช้แบคเทอริโอซินคือ ไนซินทางการค้าที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อที่นำมาทดสอบ รวมถึงทำการเปรียบเทียบความคุ้มทุนในการใช้ไนซินเป็นสารควบคุมการเจริญเพื่อยืดอายุของน้ำอ้อย โดยได้ทำการศึกษาผลของไนซินทางการค้าที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-500 IU/ml) กับแบคทีเรียแลคติกที่พบในน้ำอ้อย โดยใช้วิธี spot-on-lawn ผลการศึกษาพบว่าเชื้อที่นำมาทดสอบสามารถถูกยับยั้งได้ด้วยไนซินทางการค้าที่ระดับความเข้มข้นต่ำ คือ 250 IU/ml ซึ่งสามารถสังเกตเห็นโซนการยับยั้งได้ จากนั้น จึงได้มีการนำไนซินทางการค้าที่ระดับความเข้มข้น 250 และ 500 IU/ml มาทดสอบผลการยับยั้งเชื้อ *Strep. mutans* ที่มีความเชื้อเริ่มต้น 10^4 CFU/ml ในน้ำอ้อย ทำการเปรียบเทียบกับน้ำอ้อยที่ไม่ใส่ไนซิน และทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส และ 4-7 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าน้ำอ้อยที่ไม่มีการเติมไนซิน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไปจะมีค่าพีเอชต่ำลง มีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่สูงขึ้นและมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากขึ้นทำให้น้ำอ้อยเกิดการเสื่อมเสีย ส่วนน้ำอ้อยที่ไม่มีการเติมไนซินแต่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส จะเกิดการเสื่อมเสียได้ช้ากว่า และน้ำอ้อยที่มีการเติมไนซินที่ระดับความเข้มข้น 250 IU/ml สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้เล็กน้อย เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นเชื้อจุลินทรีย์อาจเจริญและทำให้อ้อยเสื่อมเสียได้ ส่วนน้ำอ้อยที่มีการเติมไนซินที่ระดับความเข้มข้น 500 IU/ml จะมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ลดลงจากตอนเริ่มต้นเป็นอย่างมาก ซึ่งส่งผลให้ค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบผลของไนซินต่อการบาดเจ็บของเชื้อที่นำมาทดสอบด้วยการดูลักษณะของเชื้อหลังสัมผัสกับไนซินความเข้มข้น 500 และ 5000 IU/ml เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ด้วยการส่องผ่าน Scanning Electron Microscope พบว่าเชื้อที่นำมาทดสอบเกิดรู ซึ่งเป็นอาการบาดเจ็บ ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่า การใส่ไนซินลงในน้ำอ้อยสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียในน้ำอ้อยทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำอ้อยให้ได้นานมากยิ่งขึ้น รวมถึงช่วยยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ทำให้ฟันผุ ซึ่งมีผลต่อผู้ที่ชอบบริโภคน้ำอ้อยได้

คำสำคัญ: ไนซิน น้ำอ้อย การพลาสเจอร์ไรซ์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Effect of nisin on *Streptococcus mutans* in sugarcane juice
Student name	Prerada Laylak Student ID 58080123
	Wipada Dornhee Student ID 58080135
	Sirichat Homsawat Student ID 58080138
Program	Bachelor of Science in Industrial Fermentation TechnologyFood
Year	2019
Advisor	Assoc.Prof.Dr. Adisorn Swetwiwat

ABSTRACT

This research aimed to study effective of bacteriocin in properly concentrate for prolonging sugarcane juice and compared the cost when applied in the industry. The study found that the most common microorganism which caused the spoilage of sugarcane juice was lactic acid bacterial strain belong to *Lactobacillus sakei*. In order to increase the benefits of sugarcane juice, we also studied the effect of nisin on *Streptococcus mutans*, which might be contaminated in the product. This strain is also a member lactic acid bacteria group and reported to cause human tooth decay. The effect results of various concentration of commercial nisin (0-500 IU/ml) on lactic acid bacteria strains which found in sugarcane juice by using spot-on-lawn method showed that the least concentration of commercial nisin could inhibited sugarcane juice spoilage bacteria was 250 and 500 IU/ml by observing the clear zone. The study also informed that used of commercial nisin at 250 and 500 IU/ml could inhibit *Strep. mutans* (10^4 cfu/ml) in sugarcane juice when compared to the control samples without nisin added under the storage at 30-32°C and 4-7°C. The results of sugarcane juice without added nisin and stored at 30-32 °C showed the decreasing of pH, increasing of the percentage of lactic acid and the number of bacteria increased which caused spoilage of sugarcane juice. The sugarcane juice without added nisin but preserved

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

at 4-7 °C showed slower spoilage of the sugarcane juice. In the case of sugarcane juice which added nisin at a concentration of 250 IU/ml could inhibit slightly number of microorganism when the storage time was longer, the microorganisms might grow and caused spoilage of sugarcane juice. In addition, the sugarcane juice which added nisin at concentration of 500 IU/ml, result that pH and percentage of lactic acid were slightly changed. The effect of nisin on *Strep. mutans* was also investigated under Scanning Electron Microscope (SEM). The SEM results implied that the surface cell membrane of *Strep. mutans* exhibited some porous which caused injury to the cells after the cells of *Strep. mutans* were attached with nisin at concentration 500 IU/ml and 5000IU/ml for 8 hours. Therefore, it can be concluded that commercial nisin could inhibit sugarcane juice spoilage bacteria and prolong the shelflife of sugarcane juice. Moreover, the use of nisin in the product could inhibit human tooth decaying bacteria.

Keywords: Nisin, Sugarcane juice, Pasteurization

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ด้วยความกรุณาจาก รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา โดยได้ให้ แนวคิด คำแนะนำ และแนวทางในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ มาโดยตลอด ที่ได้คอยช่วยเหลือทำให้รายงานฉบับนี้สำเร็จ ทางคณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ รวมถึงทุกคนในครอบครัวของคณะผู้จัดทำ ในการเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา ทำให้คณะผู้จัดทำมีแรงใจในการทำงานวิจัยและไม่ท้อถอยนอกจากนั้นยังคอยสนับสนุนการทำงานวิจัยนี้มาโดยตลอด รวมถึงขอบคุณสมาชิกในคณะผู้จัดทำทุกคนที่คอยช่วยเหลือซึ่งกันและกันเสมอ จึงทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการสนับสนุนการจัดทำเล่มปัญหาพิเศษนี้ ทั้งด้านต้นแบบการจัดทำเล่มปัญหาพิเศษ รวมถึงการจัดทำรูปเล่ม

พีรดา ลายลักษณ์
วิภาดา ดอนฮี้
ศิริฉัตร หอมสวัสดิ์
15 พฤษภาคม 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

ABSTRACT II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ VI

สารบัญตาราง VI

สารบัญภาพ VI

บทที่ 1 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา 1

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 3

2.1 อ้อย (Sugarcane) 3

2.2 น้ำอ้อย (Sugarcane juice) 3

2.3 ชนิดของเชื้อที่ใช้ในการตรวจสอบ 3

2.3.1 Streptococcus mutans 3

2.3.2 Lactobacillus spp. 4

2.4 สารที่ใช้ในการยับยั้ง 5

2.4.1 แบคทีริโอซิน (Bateriocin) 5

2.4.2 ไนซิน (Nisin) 7

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8

บทที่ 3 11

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี 11

3.1.1 วัตถุดิบ 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ 11
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ 11
3.1.4 สารเคมี 11
3.2 อุปกรณ์ 11
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง 13
3.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus mutans* 13
3.3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus sakei* 13
3.3.3 การพาสเจอร์ไรส์น้ำอ้อย 13
3.3.4 การทดสอบผลของไนซินทางการค้าต่อการยับยั้งเชื้อ *Strep. mutans* ในน้ำอ้อย 13
3.3.5 ตรวจสอบผลของไนซินทางการค้าในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ 14
3.3.6 การทดสอบการบาดเจ็บของเชื้อ โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) 15
บทที่ 4 16
4.1 การทดสอบผลของแบคไนซินทางการค้าต่อการยับยั้งเชื้อ *Strep. mutans* ในน้ำอ้อย 16
4.2 การศึกษาผลของไนซินทางการค้าต่อการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ 28
4.3 การทดสอบการบาดเจ็บของเชื้อ *Streptococcus mutans* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด 28
4.4 วิจารณ์ผลการทดลอง 31
บทที่ 5 33
5.1 สรุปผล 33
5.2 ข้อเสนอแนะ 34
บรรณานุกรม 35
ภาคผนวก 38
ภาคผนวก ก 39
ภาคผนวก ข 41
ภาคผนวก ค 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง 45

ภาคผนวก จ 46

ภาคผนวก ฉ 47

ภาคผนวก ช 49

ภาคผนวก ซ 50

ประวัติผู้เขียน 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงผลค่าพีเอช (pH) ในน้ำอ้อยที่มีไนซินระดับต่างๆ โดยมีเชื้อ *Strep. mutans* เริ่มต้น 10^4 CFU/ml และเก็บในอุณหภูมิ 30-32 และ 4-7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 56 ชั่วโมง.....18

ตารางที่ 4.2 ตารางแสดงผลค่าเปอร์เซ็นต์ Brix ในน้ำอ้อยที่มีไนซินระดับต่างๆ โดยมีเชื้อ *Strep. mutans* เริ่มต้น 10^4 CFU/ml และเก็บในอุณหภูมิ 30-32 และ 4-7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 56 ชั่วโมง.....19

ตารางที่ 4.3 ตารางแสดงผลค่าเปอร์เซ็นกรดแลคติกในน้ำอ้อยที่มีไนซินระดับต่างๆ โดยมีเชื้อ *Strep. mutans* เริ่มต้น 10^4 CFU/ml และเก็บในอุณหภูมิ 30-32 และ 4-7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 56 ชั่วโมง....20

ตารางที่ 4.4 ปริมาณเชื้อ Streptococcus matans ในน้ำอ้อยที่มีไนซินระดับต่างๆ โดยมีเชื้อ *Strep. mutans* เริ่มต้น 10^4 CFU/ml และเก็บในอุณหภูมิ 30-32 และ 4-7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 56 ชั่วโมง.....26

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของเชื้อ *Streptococcus mutans* 4

ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างในส่วนต่างๆของแบคทีริโอซิน Class II และการเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย..... 5

ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของไนซิน 7

ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงผลค่าพีเอช (pH) ที่ระดับเชื้อเริ่มต้น 10^4 ระหว่างอุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส และระดับเชื้อเริ่มต้น 10^4 อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส..... 22

ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงผลค่าเปอร์เซ็นต์ Brix ที่ระดับเชื้อเริ่มต้น 10^4 ระหว่างอุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส และ ระดับเชื้อเริ่มต้น 10^4 อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส..... 23

ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงผลค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ที่ระดับเชื้อเริ่มต้น 10^4 ระหว่างอุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส และ ระดับเชื้อเริ่มต้น 10^4 อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส 24

ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Strptococcus mutans* ในน้ำอ้อย ระหว่างอุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส และ ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส..... 27

ภาพที่ 4.5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สามมิติแบบส่องกราดของเชื้อ *Streptococcus mutans* ที่ไม่ได้ทำการใส่ไนซิน 29

ภาพที่ 4.6 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สามมิติแบบส่องกราดของเชื้อ *Streptococcus mutans* หลังจากใส่ไนซินเข้มข้น 500 IU/ml เป็นเวลา 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส..... 30

ภาพที่ 4.7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สามมิติแบบส่องกราดของเชื้อ *Streptococcus mutans* หลังจากใส่ไนซินเข้มข้น 5000 IU/ml เป็นเวลา 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส 30

ภาพที่ 4.8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สามมิติแบบส่องกราดของเชื้อ *Streptococcus mutans* หลังจากใส่ไนซินเข้มข้น 500 IU/ml เป็นเวลา 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส 31

ภาพที่ 4.9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สามมิติแบบส่องกราดของเชื้อ *Streptococcus mutans* หลังจากใส่ไนซินเข้มข้น 5000 IU/ml เป็นเวลา 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส..... 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากในปัจจุบันน้ำอ้อยเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถหาซื้อได้ง่าย ซึ่งผู้ประกอบการส่วนมากมักจะทำการคั้นสดแล้วนำมาจำหน่ายโดยไม่ได้มีการทำการฆ่าเชื้อใดๆก่อน ซึ่งคุณภาพของน้ำอ้อยที่ได้ไม่ได้มีการควบคุมให้มีคุณภาพที่ดีเทียบเท่ากันทุกขวด และอาจมีการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เพื่อนำมาจำหน่ายในครั้งอื่นๆ จึงทำให้อาจเกิดการปนเปื้อนหรือมีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้น้ำอ้อยเกิดการเสื่อมเสียได้ ซึ่งหากมีการเสื่อมเสียของน้ำอ้อยจะทำให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ด้วยเหตุผลเหล่านี้คณะผู้ดำเนินการวิจัยจึงได้มีการค้นคว้าหาข้อมูลซึ่งได้ทราบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในน้ำอ้อยส่วนมากเป็นLactic acid bacteria ซึ่งที่พบส่วนมากคือเชื้อ *Lactobacillis* spp. และอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อที่ทำให้ฟันผุซึ่งอาจทำให้เกิดผลกระทบต่อผู้บริโภคได้ คือเชื้อ *Streptococcus mutans* (Samot and Badet, 2012) และเมื่อได้ทำการค้นคว้าเพิ่มเติมพบว่าแบคทีเรียแลคติกที่มีผลต่อการเสื่อมเสียของน้ำอ้อยมากที่สุดคือเชื้อ *Lb. casei* (ชญานาถ, 2561) ซึ่งทางคณะผู้ดำเนินการวิจัยได้เลือกใช้ไนซินในการเป็นสารที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อนี้ เนื่องจากไนซินเป็นวัตถุกันเสียที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรม การออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสีย และก่อโรค ซึ่งมีความคงตัวในผลิตภัณฑ์ที่มีค่า pH ที่เป็นกรดและทนต่ออุณหภูมิที่สูงได้ และยังถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนในทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ เมื่อทราบข้อมูลเหล่านี้แล้วทางคณะผู้ดำเนินการวิจัยจึงได้คิดทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของไนซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Strep. mutans* ในน้ำอ้อย เพื่อให้ผลิตภัณฑ์น้ำอ้อยมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานมากขึ้นและมีคุณภาพที่ดีสะอาดและปลอดภัยเทียบเท่ากันทุกขวด

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของไนซินที่มีผลต่ออายุการเก็บรักษาของน้ำอ้อย

1.2.2 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของไนซินที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อกลุ่ม Lactic acid Bacteria ที่สามารถแยกได้จากน้ำอ้อย

1.2.3 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของไนซินที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *Strep. mutans* ที่มีผลทำให้เกิดการฟันผุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 เพื่อที่จะพิสูจน์ได้ว่าไนซินมีผลในการยืดอายุการเก็บรักษาของน้ำอ้อยได้

1.3.2 เพื่อที่จะพิสูจน์ได้ว่าไนซินมีผลต่ออายุการยับยั้งเชื้อในกลุ่ม lactic acid bacteria ที่มีผลทำให้น้ำอ้อยเสื่อมเสียได้ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ในทางการค้าได้

1.3.3 เพื่อที่จะพิสูจน์ได้ว่าไนซินมีผลต่ออายุการยับยั้งเชื้อ *Strep. mutans* ที่สามารถทำให้เกิดการฟันผุได้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อ้อย (Sugarcane) (Viela and Del., 2017)

อ้อย (Sugarcane) หรือชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Saccharum officinarum* เป็นพืชตระกูลหญ้าชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากเมื่อพิจารณาในด้านของผลผลิต เนื่องจากอ้อยสามารถใช้ปัจจัยต่างๆสำหรับในการเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น แสงแดด น้ำ อากาศ และธาตุอาหาร นอกจากนี้อ้อยยังเป็นพืชที่เพาะปลูกง่ายและเมื่อทำการปลูกครั้งหนึ่งแล้วจะสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้หลายครั้ง อ้อยมักจะเจริญเติบโตได้ดีที่อากาศร้อนและชุ่มชื้น ดังนั้นประเทศที่ปลูกอ้อยซึ่งมีประมาณ 70 ประเทศจึงอยู่ในแถบร้อนและชุ่มชื้นรวมถึงประเทศไทยด้วย ซึ่งอ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่เกษตรกรนิยมปลูกกัน ซึ่งทุกส่วนของอ้อยนั้นมีประโยชน์ทั้งหมด แต่ส่วนที่นิยมนำมาใช้มากที่สุดนคือส่วนของลำต้น ซึ่งในลำต้นของอ้อยจะประกอบด้วยสารต่างๆเช่น แอลกอฮอล์ กรดอะมิโน เป็นต้น

2.2 น้ำอ้อย (Sugarcane juice) (พิมพ์เพ็ญ และ นิธิยา., 2553)

น้ำอ้อย หมายถึง เครื่องดื่มชนิดหนึ่งที่ได้จากการนำอ้อยที่อยู่ในสภาพที่ดี มาทำการตัดเป็นท่อน ปอกเปลือก แล้วนำไปล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นทิ้งไว้ให้อ้อยสะเด็ดน้ำ จึงนำไปบีบ (หีบ) เพื่อให้ได้น้ำอ้อย เมื่อได้น้ำอ้อยแล้วจึงนำไปกรองโดยไม่มีการเจือน้ำ และไม่มีการแต่งรสด้วยน้ำตาล นำบรรจุในภาชนะบรรจุทันที หรือนำไปผ่านกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนก่อนทำการบรรจุ

โดยน้ำอ้อยมีการแบ่งประเภทได้เป็น 2 ประเภทด้วยกัน คือ

1.) น้ำอ้อยสด หมายถึง น้ำอ้อยที่ไม่ผ่านกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน

2.) น้ำอ้อยพาสเจอร์ไรซ์ หมายถึง น้ำอ้อยที่ผ่านกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส

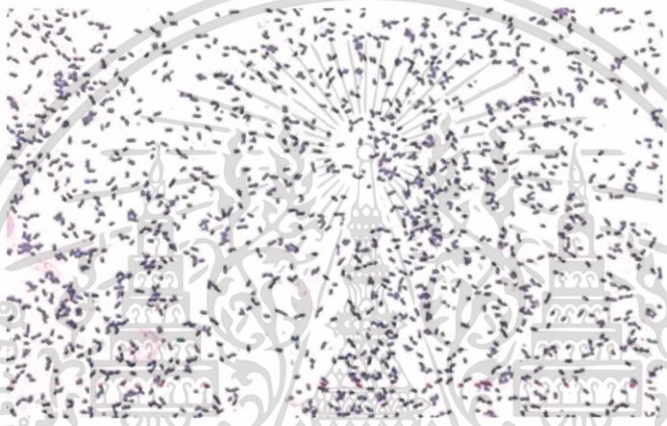
2.3 ชนิดของเชื้อที่สำคัญในน้ำอ้อยและเชื้อที่มีผลต่อมนุษย์ผู้บริโภคน้ำอ้อย

2.3.1 Streptococcus mutans

Strep. mutans เป็นแบคทีเรียในสภาวะกึ่งออกซิเจน แกรมบวก รูปกลม (ภาพที่ 1) พบโดยทั่วไปในช่องปาก และเป็นสาเหตุของฟันผุ พบครั้งแรกโดย Clarke ในปี ค.ศ.1924 (จากการอ้างอิงของ Loesche,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1996) โดยพบว่าในช่องปากของมนุษย์จะมีเชื้อประจำถิ่นอยู่ในปาก ซึ่งเมื่อเชื้อเหล่านี้โตขึ้น และเกิดการเมตาโบลิซึมขึ้นจะทำให้เกิดแผ่นคราบจุลินทรีย์ขึ้นบนส่วนต่างๆ ของช่องปาก และถึงแม้ว่าสภาวะในช่องปากเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น เกิดสภาวะกรด แบคทีเรียที่สามารถทนกรดได้ เช่น *Strep. mutans* จะเจริญมากขึ้น และจะทำให้แบคทีเรียตัวอื่นๆ ตายลงโดย *Strep. mutans* เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนกรดและผลิตกรดได้ เมื่อมนุษย์รับประทานน้ำตาลเข้าไป เช่น น้ำตาลทราย หรือน้ำตาลซูโครส รวมถึงน้ำจากพืชที่มีรสหวาน และมีน้ำตาลสูง เช่น น้ำอ้อย เชื้อจะนำน้ำตาลที่ได้ไปทำการหมักให้กลายเป็น กรดแลคติก และทำให้สภาวะในช่องปากเป็นกรด กรดจึงทำให้แร่ธาตุที่อยู่ในฟันเกิดการละลายตัว และนำไปสู่การเกิดโรคฟันผุในที่สุด (Loesche, 1996)



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของเชื้อ *Streptococcus mutans*

ที่มา : http://microbecanvas.com/Bacteria.php?p=1183

2.3.2 Lactobacillus spp.

Lactobacillus spp. เป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มที่ใหญ่สุด เซลล์มีรูปร่างท่อนหรือทรงรี (coccobacilli) มีการเรียงตัวเป็นสาย ไม่สร้างสปอร์และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส แต่บางสายพันธุ์จะพบการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลส (pseudocatalase) ซึ่งมีความสามารถในการทนกรด และต้องการสารอาหารหลายชนิดจึง สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิกว้างคือ 2-53 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30-40 องศาเซลเซียส และมีค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญคือ 5.5-6.2 (กรรณิการ์, 2549; Axelsson, 2004; Sneath และคณะ, 1986) แบคทีเรียชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก (Hammes และคณะ, 1991) ตัวอย่างเช่น *Lb. casei* มีบทบาทสำคัญในผลิตภัณฑ์นมและนมหมัก (Teuber, 1993) ซึ่งแบคทีเรียที่พบส่วนมากในน้ำอ้อยคือแบคทีเรียแลคติกในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. ซึ่งสายพันธุ์ที่มี

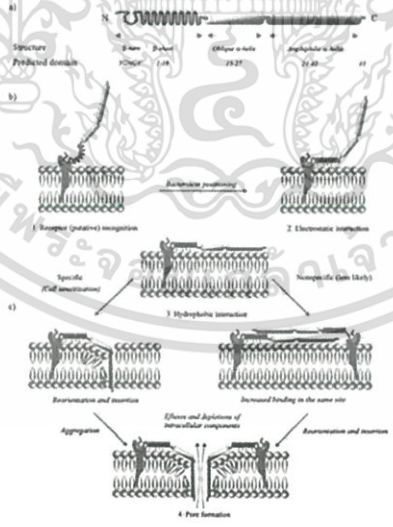
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนทำให้น้ำอ้อยเสื่อมเสียมากที่สุดคือ *Lb. casei* ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วยไนซินได้มากกว่าเชื้อ *Leuconostoc* spp. (Choi and Park, 2000)

2.4 สารที่ใช้ในการยับยั้ง

2.4.1 แบคทีริโอซิน (Bateriocin)

แบคทีริโอซิน เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นโปรตีนหรือเป็ปไทด์ซึ่งมีแบคทีเรียหลายชนิดสามารถสร้างขึ้นและหลั่งออกมาฆ่าแบคทีเรียชนิดอื่นได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม หรือ มีความต้องการทางชีวภาพคล้ายๆกัน เช่น อาหาร หรือแหล่งที่อยู่อาศัย เพื่อให้ตัวเองสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้หรือใช้สารอาหารได้ดีขึ้นแบคทีริโอซินจะมีคุณสมบัติแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ในด้านการออกฤทธิ์ที่มีการออกฤทธิ์อย่างจำเพาะเจาะจงกับแบคทีเรียเป้าหมายซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินได้เป็นส่วนใหญ่ และเนื่องจากแบคทีริโอซินมีโครงสร้างทางเคมีเป็นโปรตีนหรือเป็ปไทด์ แบคทีริโอซินจึงถูกย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์ เช่น ทริปซิน (trypsin) หรือ แอลฟา ไคโมทริปซิน (a-chymotrypsin) ดังนั้นแบคทีริโอซินจึงถูกย่อยสลายได้ในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ นอกจากนั้นแบคทีริโอซินยังสามารถออกฤทธิ์ได้ภายใต้สภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด (pH) ช่วงหนึ่งเท่านั้น แบคทีริโอซินจึงได้รับการจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มสารที่ปลอดภัย (GRAS, generally recognized as safe) แบคทีริโอซินสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (ภาพที่ 2) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์สูญเสียไอออนและ แรงขับเคลื่อนประจุ ทำให้เซลล์ตายในที่สุด



ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างในส่วนต่างๆของแบคทีริโอซิน Class II และการเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

a. โครงสร้างของแบคเทอริโอซิน

b. การเข้าจับกันของแบคเทอริโอซินกับผิวของเซลล์เป้าหมาย

c. การแทรกตัวของแบคเทอริโอซิน ทำให้เกิดช่องว่างและการเกิดการผ่านเข้าออกของน้ำ

ที่มา : Ennahar และคณะ (2000)

โดย Klaenhammer ในปี ค.ศ.1993 ได้จัดจำแนกแบคทีริโอซินออกเป็น 3 กลุ่ม (class I, class II, class III) ตามลักษณะโครงสร้างปฐมภูมิ ดังนี้

Class I (Lantibiotic) เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็ก (มวล<5 kDa) ทนความร้อน แบคทีริโอซินในกลุ่มนี้มีการเปลี่ยนแปลงภายหลังการสร้างโดยการดึงน้ำออกจาก serine และ threonine ได้เป็น didehydroalanine (Dha) และ didehydrobutyrine (Dhb) ซึ่งต่อมามีการเติม cysteine โดยใช้หมู่ SH เติมที่ C=C ของ Dha หรือ Dhb เกิดเป็น thioether amino acid ซึ่งมีคุณสมบัติทนกรดด้วย เรียกว่า lanthionine ตัวอย่างของแบคทีริโอซินในกลุ่มนี้คือ nisin ซึ่งสร้างโดยเชื้อแบคทีเรีย *Lactococcus lactis*

Class II เป็นแบคทีริโอซินที่มีขนาดเล็ก (มวล<10 kDa) ทนความร้อน แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายหลังการสร้างเหมือนที่เกิดใน class I ซึ่งจำแนกต่อไปได้อีกเป็นกลุ่มย่อย (subclasses) ดังนี้

Subclass IIa เป็นแบคทีริโอซินที่มีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ (conserve) คือ YGNGV ที่ด้าน N-terminus ตัวอย่างของแบคทีริโอซินในกลุ่มนี้คือ pediocin ที่ผลิตโดย LAB หลายชนิด ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* และ *P. acidilactici* นอกจากนี้ยังมีแบคทีริโอซินชนิดอื่น เช่น plantaricin 423 ซึ่งสร้างโดยเชื้อ *Lb. plantarum* 423

Subclass IIb เป็นแบคทีริโอซินที่การออกฤทธิ์จะเกิดได้ก็ต่อเมื่อสายโพลีเป็ปไทด์สองสาย ที่ไม่มีโครงสร้างปฐมภูมิที่คล้ายคลึงกันเลยมาประกอบกันเพื่อทำงานร่วมกัน ตัวอย่างของแบคทีริโอซินในกลุ่มนี้ เช่น plantaricin EF และ JK ซึ่งสร้างโดยเชื้อ *Lb. plantarum* C11 Subclass IIc เป็นแบคทีริโอซินที่มี secondary-independent leader peptide ซึ่ง C-terminus ของแบคทีริโอซินประกอบด้วย ATP-binding cassette ที่ทำหน้าที่ในการส่งแบคทีริโอซินออกนอกเซลล์ ตัวอย่างของแบคทีริโอซินในกลุ่มนี้ เช่น lactococcin A ซึ่งสร้างโดยเชื้อแบคทีเรีย *Lc. lactis* และ plantaricin A ซึ่งสร้างโดยเชื้อ *Lb. plantarum* C11 เช่นกัน

Class III เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ (มวล>30 kDa) ไม่ทนความร้อน ยังไม่มีการศึกษากันมากนัก ตัวอย่างของแบคทีริโอซินในกลุ่มนี้ คือ helveticin J ซึ่งสร้างโดยเชื้อแบคทีเรีย *Lc. helveticus* 481

จะเห็นว่าแบคทีเรียชนิดหนึ่งอาจจะสร้างแบคทีริโอซินได้มากกว่าหนึ่งชนิด เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lb. plantarum, Lc. lactis และแบคทีเรียต่างชนิดกันสามารถสร้างแบคทีริโอซินชนิดเดียวกันได้ เช่น *P. pentosaceus, P. acidilactici* เนื่องจากแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ที่ใช้ในการหมักอาหารเพื่อให้เกิดความเปรี้ยวในอาหารหลายชนิดที่เราบริโภคในชีวิตประจำวันมักเป็นเชื้อในกลุ่มแลคติก และในกลุ่มนี้หลายสายพันธุ์จะสร้างแบคทีริโอซิน เช่น แบคทีเรียในสกุล Lactobacillus, Pediococcus และ Lactococcus ดังกล่าวข้างต้น จึงสามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์ในการควบคุมทางชีวภาพ เช่น มีการประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินในอุตสาหกรรมอาหารโดยการผสมแบคทีริโอซิน หรือ เชื้อที่สร้างแบคทีริโอซินในอาหารเพื่อฆ่าเชื้อที่ไม่ต้องการที่อาจปนเปื้อนมาและทำให้อาหารบูดเน่า และยังสามารถใช้ฆ่าเชื้อก่อโรคที่มักพบในอาหารนั้น ดังตัวอย่างที่พบในปัจจุบันที่มีการใช้แบคทีริโอซินเพื่อฆ่าเชื้อในอาหาร เช่น ใช้ nisin ผสมในอาหารเพื่อฆ่าเชื้อ *Listeria monocytogenes* ดังนั้นแบคทีริโอซินจึงน่าจะมีศักยภาพในการเป็นสารถนอมอาหารทางเลือกที่ปลอดภัย (Klenhammer, 1993)

2.4.2 ไนซิน (Nisin)

ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่นิยมใช้ทางการค้าอย่างแพร่หลาย ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ *Lc. lactis* subsp. *lactis* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 หน่วย (Shiba และคณะ, 1991) มี lanthionine 1 หน่วยและ β–methyllanthionine 4 หน่วย ซึ่งไนซินมีประจุสุทธิเป็นบวก มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำคือบริเวณปลาย C และไม่ชอบน้ำคือบริเวณปลาย N (De Vuyst และ Vandamme, 1994) ดังแสดงในภาพที่ 3

ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของไนซิน

ที่มา : https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/nisin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งไนซินมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากไนซินจะมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก แต่ในแบคทีเรียแกรมลบจะมีส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ที่มี lipopolysaccharide เป็นส่วนประกอบจึงมีความสามารถในการต้านทานต่อไนซินได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Abee และคณะ, 1995; Sahl และคณะ, 1995; Ray, 1993; Venema และคณะ, 1995) แต่ก็มีรายงานว่าไนซินสามารถยับยั้ง *Salmonella* spp. และแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ เมื่อใช้ร่วมกับ chelating agent เช่น EDTA ซึ่งจะมีผลไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย ทำให้เซลล์มีความไวต่อแบคเทอริโอซินมากขึ้น (Blackburn และคณะ, 1989; Steven และคณะ, 1991)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กีรติ (2555) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำอ้อยเข้มข้นและน้ำอ้อยพร้อมดื่ม เนื่องจากน้ำอ้อยนั้นได้รับความสนใจจากผู้บริโภคในหลายประเทศ เนื่องจากน้ำอ้อยมีรสชาติที่อร่อยและมีประโยชน์หลายอย่าง แต่เนื่องจากน้ำอ้อยมีอายุการเก็บรักษาที่สั้น จึงทำให้การขยายตลาดของน้ำอ้อยในต่างประเทศนั้นเป็นไปได้ยาก เนื่องจากผลิตภัณฑ์น้ำอ้อยมีข้อจำกัดที่ค่อนข้างมาก โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิจัยและพัฒนากระบวนการที่จะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของน้ำอ้อยโดย 2 วิธีการ คือ กระบวนการผลิตน้ำอ้อยเข้มข้นแช่แข็งและน้ำอ้อยพร้อมดื่มโดยทำการทดลองที่ภายใต้ความดันสุญญากาศ 70 ซม.ปรอท และมีอุณหภูมิน้ำร้อน 70 องศาเซลเซียส และได้ทำการผลิตน้ำอ้อยที่ความเข้มข้น 69, 72, 73, และ 74.4 brix เพื่อใช้ศึกษาและตรวจวิเคราะห์ในด้านคุณภาพของน้ำอ้อยที่เก็บภายใต้สภาวะแช่แข็งและที่อุณหภูมิอ้อย จากการศึกษาพบว่าหลังจากการเก็บน้ำอ้อยเป็นเวลา 1 ปี พบว่าน้ำอ้อยที่นำมาทำการทดลองได้มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพไปเพียงเล็กน้อย และเมื่อเก็บน้ำอ้อยที่สภาวะแช่แข็งนาน 6 เดือน ได้มีการทดสอบคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส พบว่าเมื่อนำน้ำอ้อยที่ความเข้มข้น 69 และ 73 brix นำมาผ่านการคืนรูปแล้วมีคุณภาพไม่ต่างจากน้ำอ้อยสด และมีการพบว่าในการฆ่าเชื้อในน้ำอ้อยโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิแบบยูเอชทีจะมีตะกอนเกิดขึ้น จึงได้มีการเปลี่ยนกระบวนการให้ความร้อนจากแบบยูเอชทีไปเป็นแบบพาสเจอร์ไรซ์น้ำอ้อยแทน โดยพบว่าการปรับกรดน้ำอ้อยให้มีค่า pH เท่ากับ 4.2 หรือต่ำว่า 4.5 แล้วทำการแยกตะกอนออกมีการเติมสารไฮโดรคอลลอยด์แล้วทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำอ้อยโดยใช้สภาวะพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จะช่วยทำให้สามารถเก็บน้ำอ้อยไว้ที่อุณหภูมิห้องได้เป็นระยะเวลานาน 6 เดือน

ชญานาถ (2561) ได้ทำการวิจัยเพื่อศึกษาการคัดเลือกแบคเทอริโอซินในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อ ใช้สำหรับการยืดอายุน้ำอ้อย จากการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่คัดแยกได้จากน้ำอ้อยเสื่อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เสียตาม ธรรมชาติ โดยนำน้ำอ้อยที่ซื้อจากร้านขายน้ำอ้อยริมทางที่คั้นน้ำอ้อยสดจำหน่ายจาก 2 ร้านค้า นำมาทำการศึกษาตรวจหาเชื้อที่เป็นปัญหาการเสื่อมเสียของน้ำอ้อย ผลการศึกษาพบว่าน้ำอ้อยเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหลังตั้งทิ้งไว้ นาน 24 ชม. คือ มีสีอ่อนลง มีตะกอน มีความขุ่นเพิ่มมากขึ้น และมีกลิ่นเปรี้ยวและกลิ่นแอลกอฮอล์ร่วม อยู่ด้วย และทำการตรวจพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในน้ำอ้อยมากที่สุดและเป็นสาเหตุที่ทำให้ น้ำอ้อยเกิดการเสื่อมเสียคือ Lactic acid bacteria ซึ่งเป็นสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. รวมถึงแบคทีเรียก่อโรคที่มีผลก่อโรคทางช่อง ปาก *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 และโรคฟันผุ *Strep. mutans* ATCC 25175 และจากการทดสอบความสามารถ ในการผลิตแบคเทอริโอซินในกลุ่มไนซินพบว่าเชื้อ *Lc. Lactis*subsp. *Lactis* Sb2 มีความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินในกลุ่มไนซิน A จึงเลือกใช้เชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb2 ที่เป็นไนซินชนิดเดียวกับไนซินบริสุทธิ์ทางการค้า มาทำการศึกษาหาความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์บางชนิดเทียบกับไนซินทางการค้า โดยนำแบคเทอริโอซินในกลุ่มไนซินที่คัดแยกจากเชื้อนี้ มาเพิ่มความเข้มข้นโดยวิธีการต่างๆ และนำมาเปรียบเทียบกับไนซินทางการค้าพบว่ามีไนซินทางการค้าเพียงชนิดเดียวที่ สามารถยับยั้งเชื้อ *Strep. mutans* ATCC 25175 ได้และพบว่าไนซินทางการค้าสามารถยับยั้ง เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบได้ทุกชนิด โดยเชื้อ *Strep. mutans* ATCC 25175 ต้องใช้ไนซินทางการคฺที่ระดับความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 1,000 IU/ml ขึ้นไป จากนั้นนำไนซินทางการค้ามาทดสอบผลการยับยั้งเชื้อ *Strep. mutans* ATCC 25175 ในน้ำอ้อย โดยใช้ไนซินที่ระดับความเข้มข้น 250 500 และ 1,000 IU/ml เปรียบเทียบกับน้ำอ้อยที่ไม่ใส่ไนซิน ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส และ 4-7 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า น้ำอ้อยที่ ไม่มีการเติมไนซิน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไปจะมีค่าพีเอชต่ำลง มีค่า เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่สูงขึ้น และมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากขึ้นทำให้น้ำอ้อยเกิดการเสื่อมเสีย ส่วน น้ำอ้อยที่ไม่มีการเติมไนซินแต่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ 4-7 องศาเซลเซียส เกิดการเสื่อมเสียได้ช้ากว่า และ น้ำอ้อยที่มีการเติมไนซินที่ระดับความเข้มข้น 250 IU/ml สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้เล็กน้อย ส่วนน้ำอ้อยที่มีการเติมไนซินที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 1,000 IU/ml มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ลดลงจากตอนเริ่มต้นเป็นอย่างมาก จึงส่งผลให้ค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ผลการศึกษาพบว่าเชื้อที่นำมาทดสอบทั้งหมด สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยไนซินทางการค้าที่ระดับความเข้มข้นต่ำ คือ 250 IU/ml โดยจะสามารถสังเกตเห็นโซนใสการยับยั้งได้ ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าการใส่ไนซินลงในน้ำอ้อยสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียในน้ำอ้อยทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำอ้อยให้ได้นานมากยิ่งขึ้น รวมถึงช่วยยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่มีผลต่อโรคฟันผุของผู้ที่ชอบบริโภคน้ำอ้อยได้

Choi และ Park (2000) ได้ทำการวิจัยพบว่าสามารถใช้ไนซินในการควบคุมปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์กิมจิ โดยมีเชื้ออินดิเคเตอร์สองชนิดคือ เชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักกิมจิที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส และเชื้อแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lb. plantarum เป็นตัวแทนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักกิมจิที่อุณหภูมิสูง โดยทำการศึกษาความสามารถของไนซินในการยับยั้งเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก พบว่าแบคทีเรียแลคติกส่วนมากที่นำมาทดสอบมีความไวต่อไนซินความเข้มข้น 100 AU/ml อีกทั้งยังพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ถูกยับยั้งโดยไนซินได้มากกว่า *Leuconostoc* spp. โดยทดสอบด้วยการนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

น้ำอ้อย จากตลาดสุวรรณภูมิ

Nisin บริสุทธิ์ทางการค้า

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

Streptococcus mutans

Lactobacillus sakei

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (De Man Rogosa and Sharpe) (ภาคผนวก ก.1)

อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI (Brain Heart Infusion) (ภาคผนวก ก.2)

3.1.4 สารเคมี

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 N (ภาคผนวก ข.2)

สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (ภาคผนวก ข.3)

ฟีนอล์ฟทาลีน

แอลกอฮอล์ 95 %

แอลกอฮอล์ 70 %

สีย้อมคริสตัลไวโอเลต (ภาคผนวก ข.5)

แกรมไอโอดีน (ภาคผนวก ข.6)

สีย้อมซาฟรานิน (ภาคผนวก ข.8)

3.2 อุปกรณ์

หลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิลิตร

หลอดเซนติฟิวจ์พลาสติกก้นแหลมขนาด 15 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลอด micro tube

จานเพาะเชื้อ

Anaerobic jar

Gas pack

Loop เขี่ยเชื้อ

ตะเกียงแอลกอฮอล์

ไมโครปิเปต

ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร

ทิป

เครื่อง vortex

ตู้ยูวี

ตู้บ่มเชื้อ

เครื่องวัด OD

ขวด Duran ขนาด 250 มิลลิลิตร

ขวด Duran ขนาด 500 มิลลิลิตร

กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร

กระบอกตวงขนาด 1000 มิลลิลิตร

Water bath

เทอร์โมมิเตอร์

คลิปหนีบกระดาษ

เครื่อง Stirrer

บิวเรต

ขาตั้งบิวเรต

ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Refractometer

pH meter

จานเพาะเชื้อพลาสติก (Petri dish)ขนาด 15x100 มิลลิลิตร

ช้อนตักสาร

แท่งแก้งคนสาร ขนาด 12 นิ้ว

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus mutans*

ทำการถ่ายเชื้อจากตัวอย่างเชื้อ *Strep. mutans* ที่ทำการคัดแยกไว้แล้ว โดยใช้ไมโครปิเปต ถ่ายเชื้อปริมาตร 200 µL ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มเชื้อใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus sakei*

ทำการถ่ายเชื้อจากตัวอย่างเชื้อ *Lb. sakei* ที่ทำการคัดแยกไว้แล้ว โดยใช้ไมโครปิเปตถ่ายเชื้อปริมาตร 200 µL ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มเชื้อใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.3 การพาสเจอร์ไรส์น้ำอ้อย

ตวงน้ำอ้อยปริมาตร 147 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง ลงในขวดดูแรนด์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำขวดดูแรนด์ที่บรรจุน้ำอ้อยวางลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อทำการพาสเจอร์ไรส์รอบแรกเสร็จเรียบร้อย นำน้ำอ้อยที่ได้ไปลดอุณหภูมิในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น นำน้ำอ้อยไปพาสเจอร์ไรส์ต่อในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสอีกครั้ง เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลา 15 นาทีรีบนำน้ำอ้อยในขวดไปลดอุณหภูมิลงในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที

3.3.4 การทดสอบผลของไนซินทางการค้าต่อการยับยั้งเชื้อ *Strep. mutans* ในน้ำอ้อย

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ *Strep. mutans* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามข้อที่ 3.3.1 เตรียมไนซินที่ความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ ได้แก่ 250 และ 500 IU/mL โดยการนำไนซินบริสุทธิ์ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน นำตัวอย่างน้ำอ้อยที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์แล้วตามข้อที่ 3.3.3 เติมเชื้อ *Strep. mutans* ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^4 CFU/ml จากนั้นเติมไนซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ระดับความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในขวดดูแรนด์ที่มีน้ำอ้อยพาสเจอร์ไรส์ที่เตรียมไว้ โดยจัดให้มีปริมาณไนซินและเชื้อ *Strep. mutans* ในขวดน้ำอ้อยชุดละ 2 ขวด ตามรายละเอียดดังนี้

- ชุดที่ 1 น้ำอ้อยพาสเจอไรส์ 147 มิลลิลิตร + เชื้อ *Strep. mutans* 1.5 มิลลิลิตร + น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร

- ชุดที่ 2 น้ำอ้อยพาสเจอไรส์ 147 มิลลิลิตร + เชื้อ *Strep. mutans* 1.5 มิลลิลิตร + ไนซิน 250 IU/ml 1.5 มิลลิลิตร

- ชุดที่ 3 น้ำอ้อยพาสเจอไรส์ 147 มิลลิลิตร + เชื้อ *Strep. mutans* 1.5 มิลลิลิตร + ไนซิน 500 IU/ml 1.5 มิลลิลิตร

จากนั้น นำขวดน้ำอ้อยแต่ละชุดไปทำการบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส และ 30-32 องศาเซลเซียส ชุดละ 1 ขวด ทำการเก็บตัวอย่างน้ำอ้อย ทั้ง 2 สภาวะ ทุกๆ 8 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำอ้อย โดยเริ่มเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, และ 56 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ลงในหลอดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ (%Brix , pH , Acidity , Bacteriocin activity) โดยค่าผลที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์เชิงสถิติ SPSS เลือกวิเคราะห์ผลโดยใช้ General linear Model หลังจากนั้นทำการเลือก Univariate โดยค่าสถิติค่า pH, %Brix และค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ในความเข้มข้นของไนซินต่างๆ และแต่ละช่วงเวลา มีการเลือกใช้ข้อมูลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยเพื่อหาค่าความแตกต่างทางสถิติ และมีการสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น สีของน้ำอ้อย การเกิดตะกอน และกลิ่น และส่องกล้องจุลทรรศน์ เพื่อยืนยันลักษณะ สัณฐานของจุลินทรีย์ ทำการ pour plate ตัวอย่างน้ำอ้อย (ภาคผนวกค.2) เพื่อตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่ชั่วโมงต่างๆ เพื่อวิเคราะห์ผลของความเข้มข้นของไนซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้

3.3.5 การทดสอบผลของไนซินทางการค้าในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์

เลี้ยงเชื้ออินดิเคเตอร์ คือ *Strep. mutans* และ *Lb. sakei* ตามวิธีการเลี้ยงในข้อ 3.3.1 และ 3.3.2 ตามลำดับนำไนซินบริสุทธิ์ที่จำหน่ายทางการค้ามาชั่ง 0.35 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3.5มิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน ทำการเจือจางความเข้มข้นของไนซินด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้น 250 และ 500 IU/ml ตามลำดับ แล้วเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BHI ในจานเพาะเชื้อ ทำการถ่ายเชื้ออินดิเคเตอร์ที่บ่มจากข้างต้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดอาหาร MRS และ BHI ในหลอดทดลอง ที่ผสม agar ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมและอุ่นอยู่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นให้เชื้อกระจายตัวในหลอดแล้วเทหลอดที่มีเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BHI จากนั้นรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แล้วหยดไนซินที่ระดับความเข้มข้น 250 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

500 IU/ml ลงบนจานเพาะเชื้อ รอจนหยดเชื้อบนจานเพาะเชื้อแห้ง นำไปบ่มตามสภาวะของเชื้ออินดิเคเตอร์แต่ละชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อจากโซนใสที่เกิดขึ้นและบันทึกผล

3.3.6 การทดสอบการบาดเจ็บของเชื้อ โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

ทำการเลี้ยงเชื้ออินดิเคเตอร์คือ *Strep. mutans* ตามวิธีการเลี้ยงในข้อ 3.3.1 นำเชื้อที่ทำการบ่มครบ 24 ชั่วโมงนำมาเทรวมกันในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่ผ่านการบ่มฆ่าเชื้อแล้วเพื่อให้เชื้อจากทุกหลอดทดลองมีความเข้มข้นที่เท่ากัน จากนั้นทำการดูดเชื้อจากฟลาสก์ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการบ่มฆ่าเชื้อแล้วลงในแต่ละหลอดทดลองปริมาตร 9 มิลลิลิตรจำนวน 3 ชุดโดยแบ่งเป็นชุดละ 3 หลอด ตามรายละเอียด ดังนี้

- ชุดที่ 1 เชื้อ *Strep. mutans* ในอาหาร BHI 9 มิลลิลิตร + Nisin 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส
- ชุดที่ 2 เชื้อ *Strep. mutans* ในอาหาร BHI 9 มิลลิลิตร + Nisin 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส
- ชุดที่ 3 เชื้อ *Strep. mutans* ในอาหาร BHI 9 มิลลิลิตร + อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI 1 มิลลิตร นำไปบ่มที่ 30-32 องศาสเซลเซียส

จากนั้นนำหลอดทดลองแต่ละชุด นำมาทำการทดลองทั้งที่ระดับความเข้มข้นของไนซินเท่ากับ 500 IU/ml และ 5000 IU/ml และทำการบ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดทั้งหมดไปทำการปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส เลือกหลอดที่ดีที่สุดนำส่วนที่ตกตะกอนมาทำการเก็บไว้แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดหรือ SEM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การทดสอบผลของไนซินทางการค้าต่อการยับยั้งเชื้อ *Strep. mutans* ในน้ำอ้อย

เนื่องจากชญานาถ (2561) ได้ทำการวิจัยพบว่าไนซินทางการค้ามีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เนื่องจากมีการสร้างโซนใส จึงได้นำไนซินทางการค้ามาใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำอ้อยเพื่อให้น้ำอ้อยมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น แต่เนื่องจากในน้ำอ้อยอาจมีความสะอาดไม่เท่ากันในทุกขวด และร้านค้าแต่ละร้านนั้นอาจมีเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่อาจจะปนเปื้อนแล้วทำให้น้ำอ้อยเกิดการเสื่อมเสียด้วยเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ใช่เชื้ออินดิเคเตอร์ ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการพลาสเจอร์ไรซ์น้ำอ้อยก่อนที่จะนำมาทำการทดสอบประสิทธิภาพของไนซินทางการค้าต่อการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ ซึ่งทำตามคำแนะนำของ Zhao และคณะ (2014) ซึ่งได้รายงานว่าการใช้ไนซินร่วมกับการใช้ความดันสูงหรือการพลาสเจอร์ไรซ์สามารถทำงานร่วมกันได้เป็นอย่างดีในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นการทดลองนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาการควบคุมคุณภาพน้ำอ้อยด้วยการใช้ไนซิน โดยใช้การศึกษาการลดลงของจำนวนเชื้อ *Strep. mutans* ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มที่ทำให้น้ำอ้อยเกิดการเสื่อมเสีย นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของการเกิดโรคฟันผุในกลุ่มผู้ที่ชอบบริโภคน้ำอ้อยอีกด้วย ซึ่งถ้าหากไนซินทางการค้าสามารถลดเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวได้ อาจจะส่งผลให้น้ำอ้อยมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น และยังเป็นการช่วยป้องกันฟันผุให้กับกลุ่มผู้ที่ชอบบริโภคน้ำอ้อยได้อีกทางหนึ่งด้วย

การศึกษาในขั้นตอนนี้จะเป็นการศึกษาประสิทธิภาพของไนซินทางการค้าต่อการยับยั้งเชื้อ *Strep. mutans* ในน้ำอ้อย โดยใช้ไนซินความเข้มข้นในระดับต่างๆ ได้แก่ control, 250 และ 500 IU/ml และมีระดับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นคือ 10^4 CFU/ml แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียสและ 4-7 องศาเซลเซียส เพื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างปัจจัยต่างๆ โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง คือชั่วโมงที่ 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48 และ 56 จากนั้นทำการตรวจผลปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเหลือรอด โดยวิธีการ pour plate แล้วนำมาพิจารณาสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อยืนยันว่าเชื้อที่พบเป็นเชื้อ *Strep. mutans* ที่ใส่เข้าไปในการศึกษา (ภาคผนวก ฉ.) นอกจากนั้นยังมีการตรวจวัดค่าพีเอช, ค่าเปอร์เซ็นต์ Brix และเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ดังแสดงในตารางที่ 4.1, 4.2 และ 4.3

จากตารางที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 ได้แสดงผลของค่าพีเอช, ค่าเปอร์เซ็นต์ Brix และเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในน้ำอ้อยตามลำดับ ผลของน้ำอ้อยที่ไม่ได้ใส่ไนซิน แสดงให้เห็นว่าค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในน้ำอ้อยมีความสอดคล้องกัน กล่าวคือเมื่อค่าพีเอชต่ำลง เปอร์เซ็นต์ Brix มีค่าลดลง และค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกจะมีค่าที่สูงขึ้น โดยในช่วงแรกค่าพีเอชและค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกจะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง ค่าพีเอชจะมีค่าที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด และค่าเปอร์เซ็นกรดแลคติกจะมีค่าที่เพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงขึ้นอย่างชัดเจน เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ *Strep. mutans* เป็นเชื้อในกลุ่มที่มีความสามารถในการสร้างกรดแลคติกได้ 1.8 โมลต่อ 1 โมลกลูโคส นอกจากจะมีความสามารถในการย่อยน้ำตาลซูโครสแล้ว ยังมีความสามารถในการย่อยน้ำตาลกลูโคส แลคโตสและฟรักโทส แล้วเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติก และสร้างสารอื่นๆในปริมาณเล็กน้อย เชื้อ *Strep. mutans* นี้เป็นแบคทีเรียแลคติกชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการทนกรดได้ (acid tolerance) (Kuramitsu, 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงผลค่าพีเอช (pH) ในน้ำอ้อย ที่มีไนซินระดับต่างๆ โดยมีเชื้อ *Strep. mutans* เริ่มต้น 10^4 CFU/ml และเก็บในอุณหภูมิ 30-32 และ 4-7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 56 ชั่วโมง

ระยะเวลา (h.)	อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส			อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		
	ความเข้มข้นไนซิน (IU/ml)			ความเข้มข้นไนซิน (IU/ml)		
	0 (Control)	250	500	0 (Control)	250	500
0	5.56±0.49	5.53±0.53	5.24±0.11	5.29±0.11	5.26±0.16	5.25±0.17
8	5.16±0.01	5.24±0.11	5.24±0.11	5.28±0.16	5.25±0.11	5.25±0.10
16	4.35±0.20	5.44±0.39	5.19±0.06	5.47±0.37	5.46±0.38	5.44±0.40
24	3.43±0.94	4.50±1.77	4.40±0.83	5.34±0.20	5.47±0.39	5.45±0.41
32	3.05±0.67	3.88±1.66	3.26±0.70	4.43±1.04	5.25±0.06	5.24±0.08
40	3.01±0.69	3.61±1.42	3.12±0.76	5.22±0.14	5.29±0.08	5.26±0.10
48	2.95±0.67	3.48±1.34	3.05±0.75	4.33±1.24	5.27±0.06	5.27±0.11
56	2.91±0.70	3.42±1.37	3.39±1.46	4.28±1.29	5.28±0.05	5.28±0.11

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ 4.2 ตารางแสดงผลค่าเปอร์เซ็นต์ Brix ในน้ำอ้อย ที่มีไนซินระดับต่างๆ โดยมีเชื้อ *Strep. mutans* เริ่มต้น 10^4 CFU/ml และเก็บในอุณหภูมิ 30-32 และ 4-7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 56 ชั่วโมง

ระยะเวลา (h.)	อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส			อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		
	ความเข้มข้นไนซิน (IU/ml)			ความเข้มข้นไนซิน (IU/ml)		
	0 (Control)	250	500	0 (Control)	250	500
0	13.00±2.26	13.00±2.26	12.95±2.19	13.00±2.26	13.00±2.26	13.00±2.26
8	13.20±2.55	12.90±2.40	12.95±2.19	13.10±2.12	13.10±2.12	13.00±2.26
16	13.00±2.26	12.90±2.40	13.00±2.26	13.00±2.26	13.20±1.98	13.20±1.98
24	13.00±2.55	12.90±2.40	13.10±2.12	13.10±2.40	13.20±2.26	13.20±2.26
32	13.00±2.26	12.90±2.40	13.10±2.12	13.10±2.40	13.20±1.98	13.10±2.12
40	12.90±2.12	13.00±2.26	13.10±2.12	12.85±2.47	13.20±1.98	13.10±2.12
48	12.80±1.98	13.00±2.26	13.00±2.26	13.00±1.98	13.20±1.98	13.10±2.12
56	13.00±2.26	13.00±2.26	12.95±2.19	13.00±2.26	13.00±2.26	13.00±2.26

ตารางที่ 4.3 ตารางแสดงผลค่าเปอร์เซ็นกรดแลคติกในน้ำอ้อย ที่มีไนซินระดับต่างๆ โดยมีเชื้อ *Strep. mutans* เริ่มต้น 10^4 CFU/ml และเก็บในอุณหภูมิ 30-32 และ 4-7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 56 ชั่วโมง

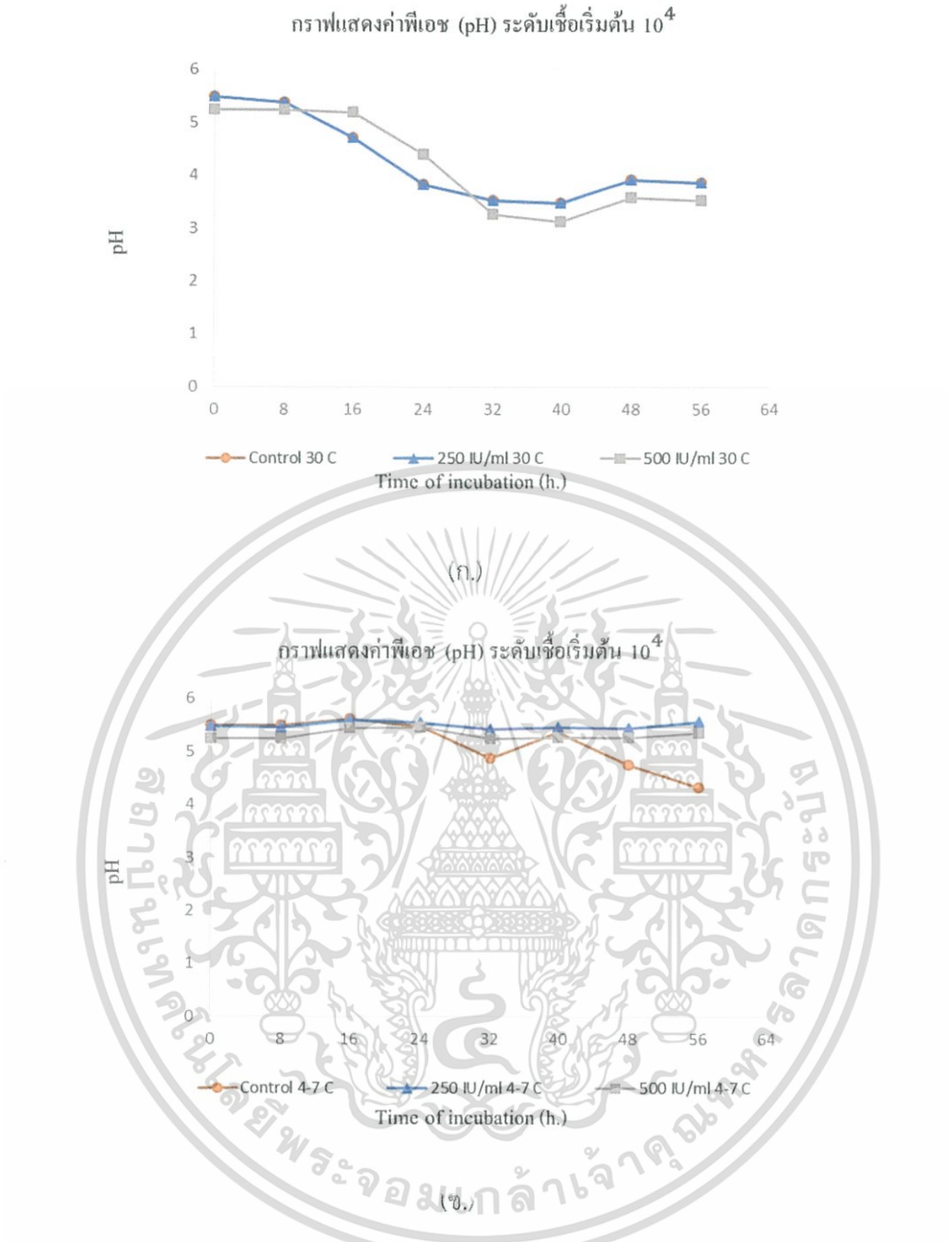
ระยะเวลา (h.)	อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส			อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		
	ความเข้มข้นไนซิน (IU/ml)			ความเข้มข้นไนซิน (IU/ml)		
	0 (Control)	250	500	0 (Control)	250	500
0	0.43±0.07	0.43±0.07	0.43±0.07	0.43±0.07	0.43±0.07	0.43±0.07
8	1.32±1.54	1.33±1.52	1.20±1.37	1.20±1.37	0.94±1.05	1.33±1.52
16	1.62±1.80	1.47±1.67	1.47±1.67	1.45±1.69	1.32±1.54	1.33±1.52
24	4.93±6.30	2.55±3.20	1.95±2.35	1.57±1.86	1.44±1.71	1.42±1.74
32	5.74±7.53	5.78±7.82	4.52±5.85	1.50±1.62	1.33±1.52	1.44±1.02
40	9.14±12.25	7.60±10.35	7.70±10.21	1.33±1.52	1.60±1.82	1.71±1.33
48	11.50±15.58	9.54±13.04	10.48±13.96	1.49±1.29	1.48±1.65	1.23±1.33

เมื่อใช้ไนซินที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ใส่ลงในน้ำอ้อยเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Strep. mutans* พบว่าการใช้ไนซินสามารถลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ลงได้ โดยสังเกตจากค่าพีเอชและค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 32 ชั่วโมง เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ลดลงทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลที่มีในน้ำอ้อยให้เกิดเป็นกรดทำให้ค่าพีเอชต่ำลงได้

จากภาพที่ 4.1 และ 4.3 แสดงค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเปรียบเทียบระหว่างที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส และ 4-7 องศาเซลเซียส ที่ระดับเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^4 CFU/ml ผลการทดลองพบว่าหลังจากเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง น้ำอ้อยที่ไม่ใส่ไนซินทั้งอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ 30-32 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีค่าพีเอชที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดและมีค่าเปอร์เซ็นกรดแลคติกเพิ่มขึ้น แต่ที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส มีค่าพีเอชที่สูงกว่าและมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่ต่ำกว่าน้ำอ้อยที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เนื่องจากพีเอชเริ่มต้นของน้ำอ้อยคือระหว่าง 5.0 ถึง 5.5 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

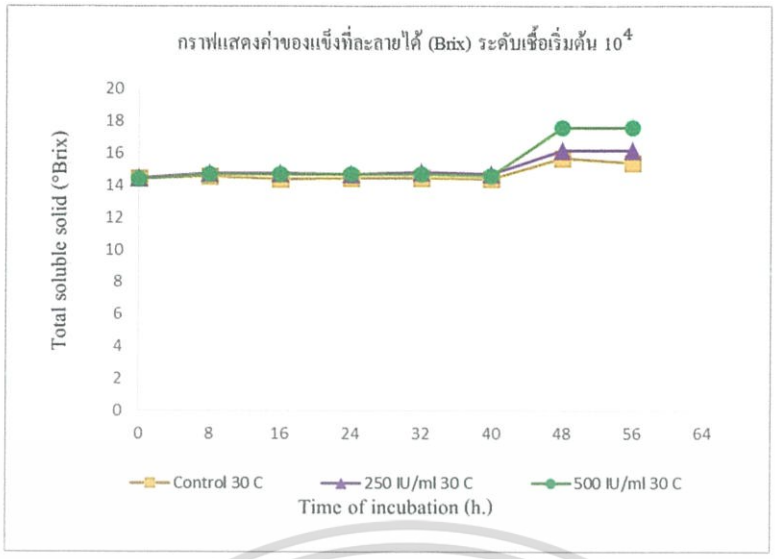
จากภาพที่ 4.1 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างการเก็บรักษาน้ำอ้อยที่อุณหภูมิ 30-32 และ 4-7 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำอ้อยที่ไม่ใส่ไนซินแต่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียสมีค่าพีเอชที่สูงกว่าน้ำอ้อยที่ไม่ใส่ไนซินแต่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส แสดงว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำสามารถทำให้เชื้อแบคทีเรียในน้ำอ้อยเจริญได้ช้าลง ส่วนน้ำอ้อยที่ใส่ไนซินพบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 และ 4-7 องศาเซลเซียสนั้นมีค่าที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าไนซินสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของน้ำอ้อยได้ นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของน้ำอ้อย ซึ่งพบว่าน้ำอ้อยที่ไม่ได้ทำการใส่ไนซินและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียสในชั่วโมงที่ 16 จะมีลักษณะของสีที่อ่อนลง มีตะกอนเกิดขึ้น และมีกลิ่นของแอลกอฮอล์ ในขณะที่ขวดที่ใส่ไนซินและทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียสจะพบลักษณะที่เปลี่ยนไปเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงในขณะที่น้ำอ้อยที่ทำการเก็บรักษาที่ 4-7 องศาเซลเซียสไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่พบว่าน้ำอ้อยเกิดการเสื่อมเสีย แต่พบว่าในขวดที่มีการเติมไนซินที่ระดับความเข้มข้นสูงน้ำอ้อยจะมีสีที่เข้มมากขึ้น แต่ไม่พบกลิ่นของแอลกอฮอล์หรือตะกอน (ภาคผนวก ซ.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

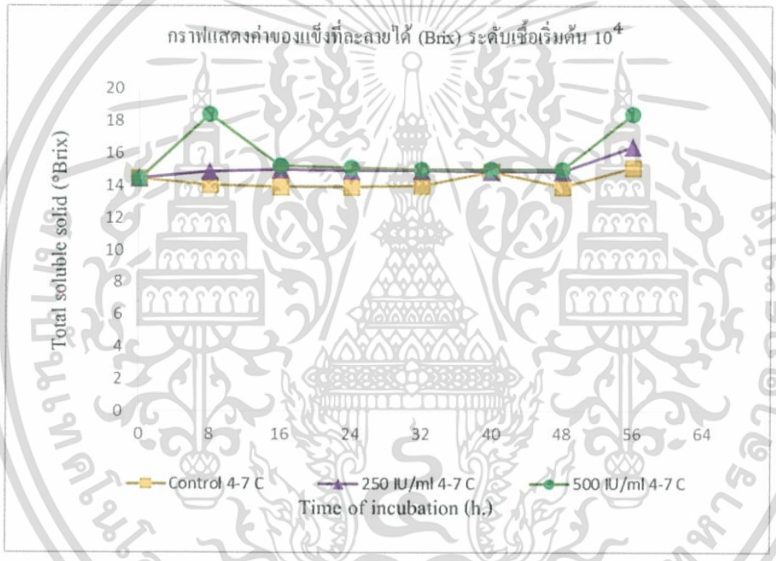


ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงผลค่าพีเอช (pH) ที่ระดับเชื้อเริ่มต้น 10^4 CFU/ml ระหว่างอุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส (ก.) และ (ข.) คือ ระดับเชื้อเริ่มต้น 10^4 CFU/ml อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



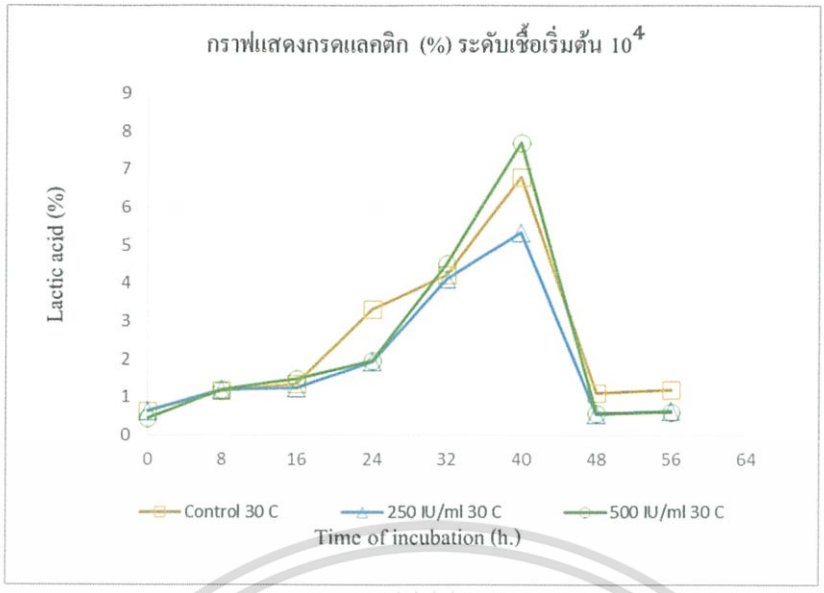
(ก.)



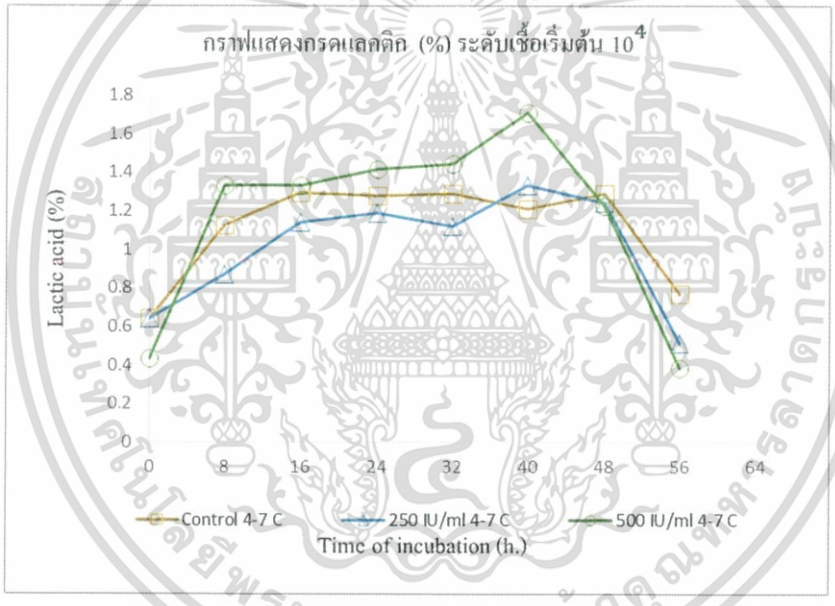
(ข.)

ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงผลค่าเปอร์เซ็นต์ Brix ที่ระดับเชื้อเริ่มต้น 10^4 CFU/ml ระหว่างอุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส (ก.) และ (ข.) คือ ระดับเชื้อเริ่มต้น 10^4 CFU/ml อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก.)



(ข.)

ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงผลค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ที่ระดับเชื้อเริ่มต้น 10^4 CFU/ml ระหว่างอุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส (ก.) และ (ข.) คือ ระดับเชื้อเริ่มต้น 10^4 CFU/ml อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส

จากตารางที่ 4.4 เป็นการแสดงจำนวนเชื้อ *Strep. mutans* ที่มีชีวิตเหลือรอดในน้ำอ้อย โดยใช้ไนซินที่ระดับความเข้มข้น 250 และ 500 IU/ml และมีระดับเชื้อเริ่มต้นคือ 10^4 CFU/ml จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า น้ำอ้อยที่ไม่ใส่ไนซินและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียสจะมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ใน

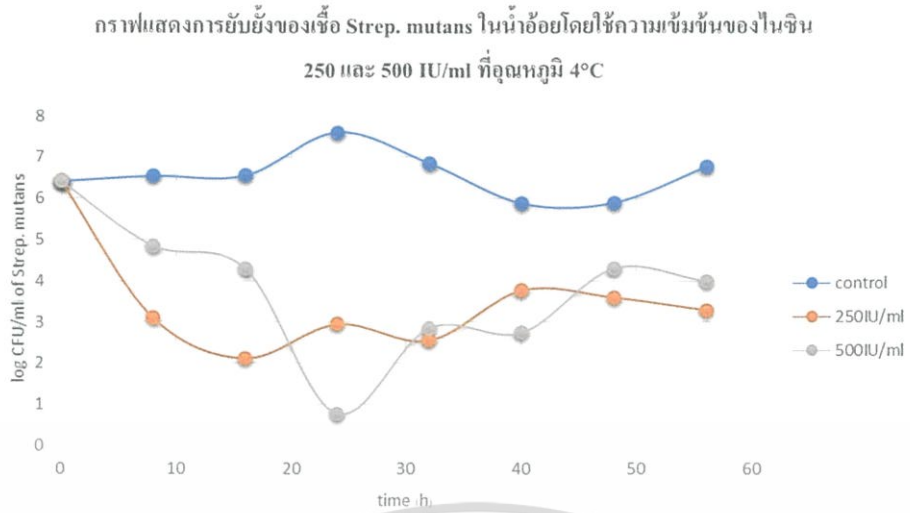
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมงที่ 24 เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 แต่เมื่อเก็บน้ำอ้อยไว้ที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียสพบว่าสามารถชะลออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Strep. mutans* ในน้ำอ้อยได้แต่ไม่ได้ทำให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียลดลง ดังนั้นเมื่อเวลาผ่านไปจะมีค่าพีเอชต่ำลง และมีค่าเปอร์เซ็นกรดแลคติกที่สูงขึ้น และมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้น้ำอ้อยเกิดการเสื่อมเสีย สำหรับน้ำอ้อยที่ใส่ไนซินความเข้มข้น 250 IU/ml นั้นสามารถยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่าน้ำอ้อยที่ใส่ไนซินที่ความเข้มข้น 500 IU/ml โดยที่ไนซินทั้งสองความเข้มข้นสามารถลดปริมาณเชื้อเริ่มต้นลงได้ แต่ในชั่วโมงที่ 24 เชื้อมีปริมาณลดลงสูงสุดในน้ำอ้อยที่ใส่ความเข้มข้นไนซินเท่ากับ 500 IU/ml และทั้งสองความเข้มข้นทำให้ค่าพีเอชและค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกมีค่าการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเวลาผ่านไปน้ำอ้อยที่ใส่ไนซินแต่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียสจะมีปริมาณเชื้อเพิ่มสูงมากขึ้นนั้นอาจเป็นผลมาจากการสลายตัวของไนซินทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถกลับมาเจริญเติบโตได้ เนื่องจากในน้ำอ้อยยังมีน้ำตาลเหลืออยู่ ซึ่งสังเกตได้จากค่า Brix และด้วยเหตุนี้จึงทำให้น้ำอ้อยเกิดการเสื่อมเสียหลังจากเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ในขณะที่น้ำอ้อยที่ใส่ไนซินและทำการเก็บรักษาที่ 4-7 องศาเซลเซียสนั้นก็มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อแต่มีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนั้นยังมีการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชและค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเพียงเล็กน้อย หลังจากผ่านเวลาไป 56 ชั่วโมง ดังนั้นการใช้ไนซินควบคู่กับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำอ้อยได้นานที่สุด ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ ชญานาถ (2561) ที่ได้รายงานผลการวิจัยว่าในน้ำอ้อยที่ไม่ได้ทำการเติมไนซิน และทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไปจะมีค่า พีเอชที่ต่ำลงและมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่สูงขึ้น และมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มากขึ้นซึ่งเป็นเหตุให้น้ำอ้อยเกิดการเสื่อมเสีย ส่วนที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส เกิดการเสื่อมเสียได้ช้ากว่า และในน้ำอ้อยที่มีการเติมไนซินที่ระดับความเข้มข้น 250 IU/ml นั้นสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้มีประสิทธิภาพต่ำกว่าในน้ำอ้อยที่มีการเติมไนซินที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 1,000 IU/ml

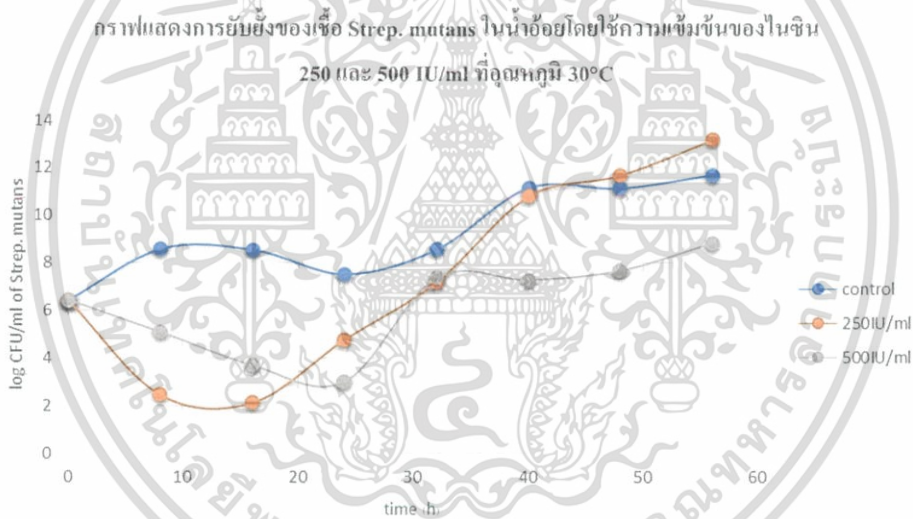
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ปริมาณเชื้อ *Streptococcus mutans* ในน้ำอ้อย ที่มีไนซินระดับต่างๆ โดยมีเชื้อ *Strep. mutans* เริ่มต้น 10^4 CFU/ml และเก็บในอุณหภูมิ 30-32 และ 4-7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 56 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml)	ระยะเวลา (h.)	อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส			อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		
		ความเข้มข้นไนซิน (IU/ml)			ความเข้มข้นไนซิน (IU/ml)		
		0 (Control)	250	500	0 (Control)	250	500
10^4	0	2.6×10^6	2.6×10^6	2.6×10^6	2.6×10^6	2.6×10^6	2.6×10^6
	8	3.76×10^8	296	1.24×10^5	3.41×10^6	1.3×10^3	7×10^4
	16	3.52×10^8	140	0.5×10^4	3.6×10^6	1.3×10^2	2×10^4
	24	3.34×10^7	6×10^4	1×10^3	4×10^7	9×10^2	6
	32	3.68×10^8	1.6×10^7	2.4×10^5	7×10^6	3.6×10^2	7.2×10^2
	40	1.44×10^{11}	6.6×10^{10}	1.94×10^7	7.6×10^5	6×10^3	5.6×10^2
	48	1.38×10^{11}	5×10^{11}	4.8×10^7	7.8×10^5	2×10^2	2×10^4
	56	5.1×10^{11}	1.56×10^{13}	7×10^8	6×10^6	2×10^3	1×10^4



(ก.)



(ข.)

ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณเชื้อ *Strptococcus mutans* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^4 CFU/ml ในน้ำอ้อยที่มีไนซินระดับต่างๆ เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส (ก.) และ (ข.) คือ เก็บที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การทดสอบผลของไนซินทางการค้าในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์

เนื่องจากน้ำอ้อยเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีรสหวาน มีปริมาณน้ำตาลซูโครสประมาณร้อยละ 15 ในการทดลองนี้ยังได้นำแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Strep. mutans* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคฟันผุมาร่วมทำการทดสอบ เพื่อดูความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำอ้อย และเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุหลังบริโภคน้ำอ้อย ซึ่งขั้นตอนนี้จะเป็นการยืนยันผลของไนซินทางการค้าว่ามีความสามารถสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคฟันผุคือ *Strep. mutans* และเชื้อที่พบในน้ำอ้อยคือ *Lb. sakei* ได้

จากผลการทดลองพบว่าไนซินทางการค้าสามารถสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งแบคทีเรียในน้ำอ้อย รวมไปถึงแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ ซึ่งพิจารณาจากโซนใสที่เกิดขึ้น ดังนั้นจึงเลือกใช้ไนซินทางการค้าในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์น้ำอ้อย

ไนซินทางการค้าเป็นแบคเทอริโอซินที่นิยมใช้ทางการค้ากันอย่างแพร่หลาย (Shiba และคณะ, 1991) และไนซินมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ ดังนั้นในขั้นตอนนี้จะเป็นการยืนยันความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกโดยไนซินทางการค้า

การเกิดโซนใสขึ้นที่ไนซินระดับความเข้มข้น 250 และ 500 IU/ml กับทั้งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดได้แก่ *Lb. sakei* และ *Strep. mutans* (ดังแสดงในภาคผนวก ช.) ซึ่งจากผลการทดลองเป็นการยืนยันให้เห็นว่าไนซินทางการค้าสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบได้ และจะเลือกใช้ไนซินในระดับความเข้มข้นคือ 250 และ 500 IU/ml จึงได้เลือกใช้ไนซินทางการค้ามาใช้ในการทดลองเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาน้ำอ้อย เนื่องจากมีงานวิจัยพบว่าเชื้อ *Streptococcus* spp. เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดและก่อให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์น้ำอ้อย (บุญส่ง, 2527)

4.3 การทดสอบการบาดเจ็บของเชื้อ *Streptococcus mutans* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

เนื่องจากผลการทดลองในข้อ 4.2 พบว่าไนซินทางการค้าสามารถสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Strep. mutans* ที่เป็นเชื้อก่อโรคฟันผุได้ การทดลองในข้อนี้คือการยืนยันว่าเชื้อ *Strep. mutans* ได้ถูกยับยั้งด้วยไนซินทางการค้า โดยการใช้ไนซินทางการค้าที่ระดับความเข้มข้น 500 IU/ml และ 5000 IU/ml ในเวลา 8 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4.5, 4.6 และ 4.7 แสดงให้เห็นความแตกต่างของเชื้อ *Strep. mutans* ในหลอดทดลองที่ไม่ได้ทำการใส่ไนซิน เชื้อ *Strep. mutans* หลังจากใส่ไนซินทางการค้าที่ระดับความเข้มข้น 500 IU/ml และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

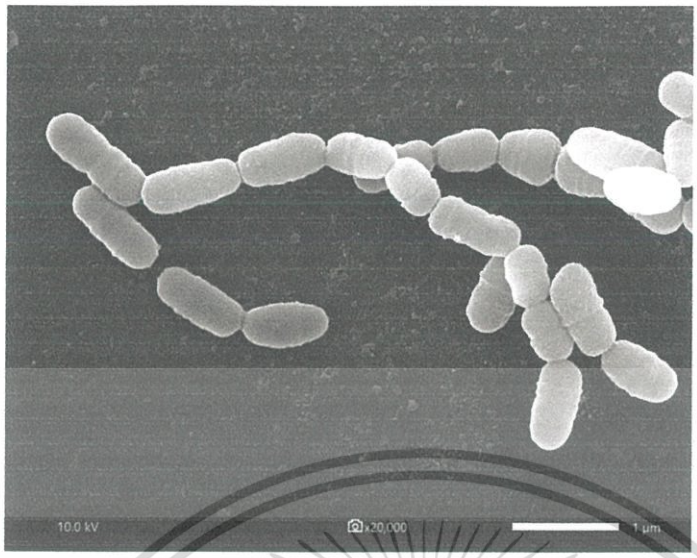
เชื้อ *Strep. mutans* หลังจากใส่ไนซินทางการค้าที่ระดับความเข้มข้น 5000 IU/ml ตามลำดับ แล้วทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงพบว่าเชื้อ *Strep. mutans* ในหลอดทดลองที่ไนซินระดับความเข้มข้น 500 IU/ml จะไม่พบการเกิดแผลบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์มากนักซึ่งต่างจากในหลอดทดลองที่ไนซินระดับความเข้มข้น 5000 IU/ml ที่จะเห็นแผลที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ชัดเจนและแผลมีขนาดใหญ่

จากภาพที่ 4.5, 4.8 และ 4.9 แสดงให้เห็นความแตกต่างของเชื้อ *Strep. mutans* ในหลอดทดลองที่ไม่ได้ทำการใส่ไนซิน เชื้อ *Strep. mutans* หลังจากใส่ไนซินที่ระดับความเข้มข้น 500 IU/mlและเชื้อ *Strep. mutans* หลังจากใส่ไนซินที่ระดับความเข้มข้น 5000 IU/ml แล้วทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส พบว่าในหลอดทดลองที่มีความเข้มข้นไนซิน 500 IU/ml จะยังไม่เห็นการเกิดแผลบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ที่ชัดเจนซึ่งแตกต่างจากเชื้อในหลอดที่ความเข้มข้นไนซิน 5000 IU/ml นั้นจะเห็นแผลที่เกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างชัดเจน

จากผลการทดลองจึงเป็นการยืนยันได้ว่าไนซินที่มีระดับความเข้มข้นที่สูงจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Strep. mutans* ได้ และอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เนื่องจากในการทดลองนี้ที่ระดับความเข้มข้นไนซิน 500 IU/ml และทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียสนั้นไม่ได้ทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บแต่เพียงแค่อุณหภูมิการเก็บรักษาที่ต่ำจะไม่ได้สามารถทำลายเชื้อ *Strep. mutans* แต่เพียงแค่ชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อเท่านั้น ดังนั้นหากจะใช้ไนซินให้ได้ผลอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นถ้าใช้ไนซินร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

ภาพที่ 4.5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สามมิติแบบส่องกราดของเชื้อ *Streptococcus mutans* ที่ไม่ได้ทำการใส่ไนซิน

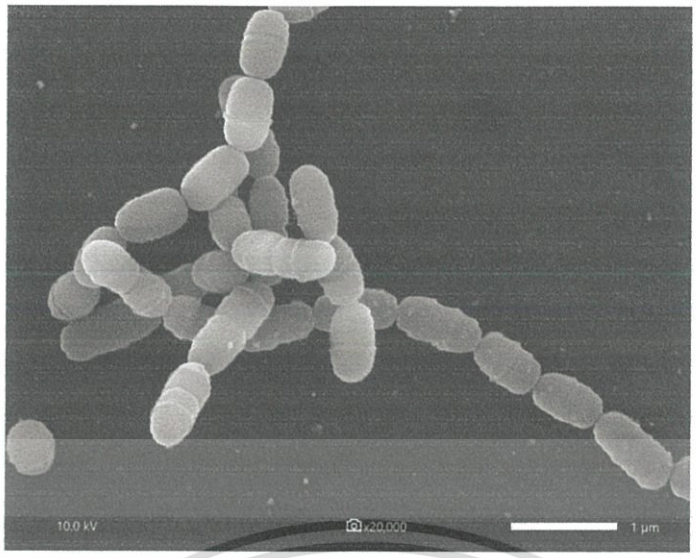
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สามมิติแบบส่องกราดของเชื้อ *Streptococcus mutans* หลังจากใส่ไนซินเข้มข้น 500 IU/ml เป็นเวลา 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 4.7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สามมิติแบบส่องกราดของเชื้อ *Streptococcus mutans* หลังจากใส่ไนซินเข้มข้น 5000 IU/ml เป็นเวลา 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สามมิติแบบส่องกราดของเชื้อ *Streptococcus mutans* หลังจากใส่ไนซินเข้มข้น 500 IU/ml เป็นเวลา 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 4.9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สามมิติแบบส่องกราดของเชื้อ *Streptococcus mutans* หลังจากใส่ไนซินเข้มข้น 5000 IU/ml เป็นเวลา 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส

4.4 วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการวิจัยของชญานาถ (2561) พบว่าไนซินทางการค้านั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Strep. mutans* ได้ซึ่งจากทดลองในวิจัยในครั้งนี้พบว่าผลของไนซินทางการค้าต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำอ้อย โดยทำการตรวจสอบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆทางเคมี เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าพีเอช เปอร์เซ็นต์ Brix และเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในน้ำอ้อย พบว่าการวิเคราะห์มีการเปลี่ยนแปลงของค่าทางเคมีที่สอดคล้องกันอย่างเห็นได้ชัดโดยพบว่าในน้ำอ้อยในขวดที่ทำการใส่ไนซินมีการลดลงของเชื้ออย่างเห็นชัดเจน แต่จากการทดลองเมื่อถึงชั่วโมงที่ 32 น้ำอ้อยในขวดที่มีการใส่ไนซินที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียสจะเกิดการสลายตัวของไนซิน จึงทำให้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์อาจมีการเพิ่มจำนวนขึ้นมาได้อีกครั้งจากเหตุผลนี้ เนื่องจากการที่น้ำอ้อยยังมีน้ำตาลหลงเหลืออยู่ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์เอาน้ำตาลไปใช้ในการเจริญเติบโตและน้ำตาลในน้ำอ้อยของแต่ละร้านค้านั้นมีปริมาณน้ำตาลที่ไม่เท่ากัน ผลที่ได้จึงอาจจะมีการคลาดเคลื่อนหากใช้น้ำอ้อยจากร้านค้าอื่น และยังพบว่านอกจากอุณหภูมิในการเก็บรักษาจะมีผลต่อการยับยั้งหรือชะลอเชื้อจุลินทรีย์แล้วยังมีผลต่อประสิทธิภาพของไนซินอีกด้วย แต่ในการทดลองในครั้งนี้ตามผลในภาคผนวก ซ. จะพบว่าน้ำอ้อยในขวดที่ทำการใส่ไนซินที่ความเข้มข้นสูงๆและทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำจะมีสีของน้ำอ้อยที่เข้มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้อาจทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคได้ และหากน้ำอ้อยไม่ได้นำมาพลาสเจอร์ไรซ์ก่อนก็อาจจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ซึ่งอาจทำให้ประสิทธิภาพของไนซินลดลงและทำให้ไม่สามารถยืดอายุการเก็บรักษาของน้ำอ้อยได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากการทดลอง การทวนสอบแบคเทอริโอซินของไนซินทางการค้า และประสิทธิภาพของไนซินทางการค้า เพื่อยืนยันว่าไนซินมีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคฟันผุ และเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในน้ำอ้อยได้ โดยผลการทดลองพบว่าไนซินทางการค้าสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบได้ เนื่องจาก เกิดโซนใสในบริเวณของการใช้ไนซินที่ระดับความเข้มข้น 250 และ 500 IU/ml กับทั้งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด คือ *Lb. sakei* และ *Strep. mutans*

จากการศึกษาผลของไนซินทางการค้าต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำอ้อย โดยใช้ไนซินที่ระดับความเข้มข้น 250 และ 500 IU/ml มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ 10^4 CFU/ml และทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส และ 4-7 องศาเซลเซียส เพื่อเปรียบเทียบระหว่างปัจจัยต่างๆ พบว่า น้ำอ้อยที่ไม่มีการเติมไนซิน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง จะมีค่าพีเอชต่ำลง มีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกสูงขึ้น และมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น ส่วนน้ำอ้อยที่ไม่มีการเติมไนซิน แต่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส เกิดการเสื่อมเสียได้ช้ากว่า แต่เมื่อเวลาผ่านไปเชื้อก็สามารถเจริญและส่งผลให้เกิดการเสื่อมเสียได้ น้ำอ้อยที่มีการเติมไนซินที่ระดับความเข้มข้นต่างกันนั้น พบว่า น้ำอ้อยที่ใส่ไนซินความเข้มข้น 250 IU/ml สามารถยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่าน้ำอ้อยที่ใส่ไนซินที่ความเข้มข้น 500 IU/ml น้ำอ้อยที่มีการเติมไนซิน 500 IU/ml มีค่าพีเอชและ เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ลดลงจากตอนเริ่มต้น แสดงให้เห็นว่าไนซินสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของน้ำอ้อยได้ สรุปได้ว่า การใช้ไนซินที่ระดับความเข้มข้น 500 IU/ml เพียงพอต่อการยืดอายุการเก็บรักษาน้ำอ้อย การใช้ไนซินควบคู่กับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำอ้อยได้นานที่สุด ซึ่งการใช้ไนซินทางการค้ากับผลิตภัณฑ์น้ำอ้อย มีส่วนช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาได้ดีขึ้น อีกทั้งยังช่วยลดโอกาสของการเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อที่ทำให้เกิดฟันผุกับผู้บริโภคได้

ผลการทดสอบการบาดเจ็บของเชื้อ *Strep. mutans* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด เป็นการยืนยันให้เห็นว่า ไนซินยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Strep. mutans* ได้จริง โดยพบว่า เมื่อนำ *Strep. mutans* ก่อนใส่ไนซินเปรียบเทียบกับเชื้อ *Strep. mutans* หลังจากใส่ไนซินทางการค้าที่ระดับความเข้มข้น 500 IU/ml แล้วเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 และ 4-7 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ทำให้พบว่าเชื้อ *Strep. mutans* เกิดการบาดเจ็บอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เห็นได้ชัดจากตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า อุณหภูมิในการเก็บรักษาเป็นปัจจัยหนึ่งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Strep. mutans* ได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1.ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลกระทบที่ได้จากการเติมไนซินลงในน้ำอ้อย เนื่องจากสีของน้ำอ้อยเมื่อทำการเติมไนซินลงไปที่ความเข้มข้นต่างๆนั้นมีสีที่เข้มขึ้นเมื่อเก็บรักษาไว้นาน อาจเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการตัดสินใจแก่ผู้ประกอบการ

2.ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเข้มข้นของไนซินที่ใช้ในการทดลองให้มีระดับความเข้มข้นที่มากขึ้นและมีหลายระดับความเข้มข้นเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความคุ้มทุนแก่ผู้ประกอบการ เนื่องจากในการทดลองยังมีจำนวนเชื้อ *Strep. mutans* หลงเหลืออยู่ที่ระดับการเจือจางสูงๆที่ความเข้มข้น 500 IU/ml

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรรณิการ์ กำลัง. 2549. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารต้านจุลชีพได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์และศึกษาสมบัติบางประการของสารต้านจุลชีพ. ปริญญาโท สาขาชีววิทยา, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.

กีรติ ภู่พวง. 2555. การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำอ้อยเข้มข้นและน้ำอ้อยพร้อมดื่ม ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิศวกรรม อาหาร) สาขาวิศวกรรมอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีการอาหาร. 2555-98.

ชญานาถ จีระกิตติโสภณ. 2561. ผลของไนซินต่อการลดจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในน้ำอ้อย. สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

บุญส่ง แสงอ่อน. 2527. บทบาทของบักเตรีในน้ำอ้อย. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2553. น้ำอ้อย Sugarcane juice. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/4032/%E0%B8%99%E0%B9%89%E0%B8%B3%E0%B8%AD%E0 %B9%89%E0%B8%AD%E0%B8%A2. (วันที่ค้นข้อมูล : 11 พฤษภาคม 2562).

Abee, T. 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protectionmechanisms of producer organisms. FEMS Microbiology Letters. 129: 1-10.

Aderlaten, B. 2017. Picture of *Streptococcus mutans*. Retrived October 29, 2018, from http://microbecanvas.com/Bacteria.php?p=1183.

Axelsson, L. 2004. Lactic acid Bacteria in Fish and Fish Farming, pp. 1-66. In Salminen, S. and Wright, A.V. (eds). Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. New York: Marcel Dekker.

Blackburn, P., Polak, J., Gusik, S. A. and Rubino, S. D. 1989 Nisin compositions for use as enhanced, broad range bactericides. International patent application number PCT/US89/0265: international publication number W089/12399.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Choi, M. H. and Park, Y. H. 2000. Selective control of lactobacilli in kimchi with nisin. Letters in Applied Microbiology. 30: 173-177.

De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. 1st Ed, Glasgow: Blackie Academic and Professional.

49

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., and Ishizaki, A.2000. Class IIa bacteriocins biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiology Reviews, 24(1), 85-106.

Hammes, W. P., Weiss, N. and Holzapfel, W. 1991. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In The prokaryotes (Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H., Eds.). 2nd Ed. Vol 2. pp. 1535-1594, NewYork: Springer-Verlag.

Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produce by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews 12(1-3), 39-85.

Kuramitsu, H. K. 1993. Virulence Factors of Mutans Streptococci: Role of Molecular Genetics. Critical Reviews in Oral Biology and Medicin. 4(2): 159-176.

Loesche, W. J. 1996. "Microbiology of Dental Decay and Periodontal Disease". In Baron's Medical Microbiology (4th ed.). Universe of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.

Ray, B. 1993. Sublethal injury. bacteriocins and food microbiology. ASM News. 59: 285-291.

Sahl, H. G., Jack, R. W. and Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post- translational modifications. European Journal of Biochemistry. 230: 827-853.

Samot, J. and Badet, C. 2012. Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health. Anaerobe. 19: 14-38.

Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G.1986. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 2. Baltimore: Williams and Wilkins.

Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A. and Klenhammer, T. R. 1991. Nisin Treatment for Inactivation of *Salmonella* Species and other Gram Negative Bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 57: 3613-3615.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Teuber, M. 1993. Lactic Acid Bacteria. In Biotechnology. Vol 1.2nd Ed eds. H. J. Rehm, G. Reed, pp. 325-366. Weinheim: VCH.

Venema, K., Venema, G. and Kok, J. 1995. Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. Trends in Microbiology. 3: 299-304.

Viela, L. and Del, B. 2017. Analysis of Three Sugarcane Homo and Homologous Regions Suggests Independent Polyploidization Event of *Saccharum Officinarum* and *Saccharum spontaneum*. 2017: 266-278.

William, G, C., 2003. Picture of Nisin. Retrived April 25, 2019 from https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/nisin

Zhao, L., Wang, S., Liu, F., Dong, P., Huang, W., Xiong, L. andLiao, X. 2014. Comparing the effects of high hydrostatic pressure and themal pasteurization combined with nisin on the quality of cucumber juice drink. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 17: 27-36.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (Difco, USA)

Dextrose	20 g
Meat peptone	10 g
Beef extract	10 g
Yeast extract	5 g
Sodium citrate	5 g
Di-Potassium hydrogen phosphate	2 g
Di-Ammonium hydrogen citrate	2 g
Tween 80	1 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g
$MnSO4 \cdot 4H_2O$	0.05 g
น้ำกลั่น	1 L
ปรับพีเอช	6.5-6.8

ละลายส่วนผสมทั้งหมดอุ่นและคนให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับพีเอช ถ้าเป็นอาหารแข็งให้เติมวุ้น (agar) 15 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร หากต้องการดูการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติก เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือเติมสีอินดิเคเตอร์โบรโมครีซอลเพอร์เพิล (Bromocresol purple) ร้อยละ 0.004 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ใน หลอดที่มีจุกสำลีหรือฝาปิดนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที

ก.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth (Oxoid, UK)

Brain infusion solids	12.5 g
Beef heart infusion solids	5 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glucose	2 g
Sodium chloride	5 g
Proteose peptone	10 g
Di-sodium phosphate	2.5 g
น้ำกลั่น	1 L
ปรับพีเอช	7.4 ± 0.2

ละลายส่วนผสมทั้งหมดอุ่นและคนให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับพีเอช ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดที่มีจุกสำลีหรือฝาปิด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมีและสีย้อม

ข.1 Normal saline (0.85% NaCl)

Sodium chloride	8.5 g
น้ำกลั่น	1 L

ละลายให้เข้ากัน แล้วนำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ข.2 การเตรียมสารละลาย NaOH 0.01 N

ชั่ง NaOH 40.0 กรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร ละลายจนหมดจะได้สารละลาย NaOH 1 N จากนั้นดูดสารละลาย 1 N NaOH มา 10 มิลลิลิตรใส่ลงในน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย NaOH 0.01N

ข.3 การเตรียม Standard Potassium Hydrogen Phthalate ($KHC_8H_4O_4$)

อบ $KHC_8H_4O_4$ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 1 คืน แล้วรีบนำออกมาเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (Dessicator) ปล่อยไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องจากนั้นแบ่ง $KHC_8H_4O_4$ มาชั่ง 3 ซ้ำๆละประมาณ 0.01 กรัม (ใช้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ห่อแยกกันไว้

ข.4 การเทียบมาตรฐาน NaOH (standardize)

นำ $KHC_8H_4O_4$ ที่ชั่งน้ำหนักไว้ทั้ง 3 ห่อมาใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร 3 ใบนำ $KHC_8H_4O_4$ จากฟลาสก์ ใบที่ 1 เติมน้ำกลั่น (ต้มให้เดือด ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง) จำนวน 50 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนจนสารละลายหมด หยดฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยดลงไปเป็นอินดิเคเตอร์ แล้วรีบทำการไทเทรตด้วย 0.01 N NaOH บันทึกปริมาตรที่ใช้ในการไทเทรต (ทำ Control เทียบกับน้ำกลั่นที่ไม่มี $KHC_8H_4O_4$ จำนวน 50 มิลลิลิตร) เสร็จแล้วดำเนินการกับ $KHC_8H_4O_4$ อีก 2 ฟลาสก์ที่เหลือ ตามลำดับทำนองเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว นำค่าปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไปคำนวณหาความเข้มข้นมาตรฐานโดยใช้สูตร

Normality = $(gm.KHC_8H_4O_4)(1000)$ (ml.NaOH)(204.229)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.5 Gram crystal violet

Solution A (stock)

Crystal violet (90% dry content)	2 g
95% Ethanol	20 ml
Solution B Ammonium oxalate	0.8 g
น้ำกลั่น	80 ml

เจือจาง Solution A ลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นแล้วผสมกับสาร Solution B ตั้งทิ้งไว้ 24 ชม. แล้วกรองก่อนใช้

ข.6 Gram iodine

Iodine	2 g
Potassiun iodine (KI)	4 g
น้ำกลั่น	300 ml

ละลาย KI ในน้ำกลั่น บด iodine แล้วละลายในสารละลาย KI กวนจนละลายหมด เก็บในขวดสีชา

ข.7 Decolorizing agent

95% Ethanol	100 ml

ข.8 Gram safranin O

safranin O	0.25 g
95% Ethanol	10 ml
น้ำกลั่น	90 ml

ละลายสีใน ethanol (กวนด้วยแท่งแก้ว) แล้วเติมน้ำกลั่น กรองก่อนใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
วิธีการที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ

ค.1 เทคนิคการ Streak plate

1. หลอมอาหารในขวดรอให้เย็นอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส 2. เทอาหารลงในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว

3. ใช้ลวดเขี่ยเชื้อเผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ 2-3 นาที เพื่อให้เย็นหรืออาจทำให้เย็นลงได้โดยนำมาแตะอาหารวุ้นในจานบริเวณที่ไม่มีเชื้อ 4. เขี่ยเชื้อที่ต้องการแยกให้ติดปลายลูป (Loop) เล็กน้อย ลากเบาๆไปมา 3-4 ครั้ง (อย่าให้วุ้นแตก) เผาปลายลูปให้ร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็นและนำมาลากบนผิวหน้าจากบริเวณที่ 1 ไปยังบริเวณที่ 2

6. เผาปลายลูปให้ร้อนแดงอีกครั้ง ทิ้งไว้ให้เย็นและนำมาลากบนผิวหน้าจากบริเวณที่ 2ไปยัง 3

7. ลากจากบริเวณที่ 3 ไปยังบริเวณที่ 4 โดยไม่จำเป็นต้องเผาลูปอีก ระวังอย่าให้เข้าไปทับบริเวณแรกที่ streak ไว้ก่อนแล้ว

8. บ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม โดยคว่ำจานลงเพื่อป้องกันไอน้ำหยดลงผิวหน้าอาหาร

ค.2 เทคนิคการ Pour plate

1. ปิเปตตัวอย่างแต่ละความเจือจาง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ

2. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส) ลงในจานเพาะเชื้อ 3. เขย่าวนจานเพาะเชื้อไปมาเพื่อให้ตัวอย่างกระจายไปทั่ว

4. นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม

ค.3 การย้อมสีแบบ Gram stain

1. หยดสี Crystal violet ลงบนสไลด์ให้ท่วมรอยเสมียร์ของเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที

2. ล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น แล้วหยดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ท่วมรอยเสมียร์และทิ้งไว้นาน 1 นาที

3. ล้างน้ำยาไอโอดีนออกด้วยน้ำและล้างอีกครั้งด้วยแอลกอฮอล์ 95% จนน้ำที่ล้างไม่มีสีติดออกมา (ใช้เวลา 20 วินาทีจากนั้นให้ล้างออกด้วยน้ำทันที)

4. ย้อมทับด้วยสี Safranin O นาน 1 นาที

5. ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วปล่อยให้สไลด์แห้ง หรือซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ

6. ตรวจผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.4 ขั้นตอนการพาสเจอไรซ์น้ำอ้อย

1. ปิเปตน้ำอ้อยใส่ในขวดทดลองพร้อมฝาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ระวังอย่าให้น้ำอ้อยโดนปากขวด)

2. นำน้ำอ้อยที่อยู่ในขวดทดลองใส่ลงในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ

3. ใช้เทอร์โมมิเตอร์จับอุณหภูมิของน้ำอ้อยในขวดให้ถึง 70 องศาเซลเซียส โดยที่เทอร์โมมิเตอร์ต้องแช่ด้วยแอลกอฮอล์และซับด้วยผ้าที่ปลอดเชื้อให้แห้งก่อนใช้งาน

4. เมื่ออุณหภูมิถึง 70 องศาเซลเซียสแล้วให้จับเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาให้รีบปิดฝาทันทีและทำให้เย็นด้วยการนำไปแช่ในน้ำเย็นทันที

5. นำน้ำอ้อยในขวดทดลองที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ไปศึกษาทดลองต่อไป

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

วิธีการวิเคราะห์ทางเคมีและจุลชีววิทยา

ง.1 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก โดยวิธี titratable acidity (AOAC, 1984)

1. ปิเปตต์ตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ตวงน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร หยดสารละลายฟีนอลฟ์ทาลีน (Phenolphthalein) 2-3 หยด

2. ไทเทรตด้วยสารละลาย NaOH มาตรฐาน จนได้สีชมพจางๆ บันทึกปริมาตรของสารละลาย NaOH ที่ใช้

3. คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่าง

สูตรคำนวณหาเปอร์เซ็นตก์รด

ปริมาณกรดทั้งหมด(%) = $(V)(N)(eq.Wt.)(100)\ (1000)(v)$

หมายเหตุ V = ปริมาณของสารละลายมาตรฐาน NaOH

N = Normality ของสารละลายมาตรฐาน NaOH

v = ปริมาณของสารละลายตัวอย่าง

Eq.Wt. = น้ำหนักสมมูลย์ของกรด (น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก

($C_3H_6O_3$) = 90.8 กรัมต่อ โมล)

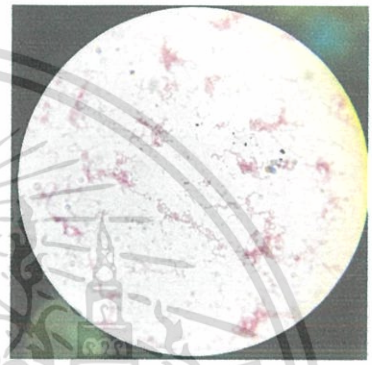
ง.2 การวัดค่าพีเอช (pH) โดยใช้เครื่องวัดพีเอชนำตัวอย่างนำอ้อย 5 มิลลิลิตรวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH-meter) (Inolab, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ลักษณะสัณฐานของเชื้อ *Strep. mutans* และ *Lb. sakei* ที่ใช้ในการทดลอง

จ.1 ตารางแสดงภาพลักษณะจุลินทรีย์

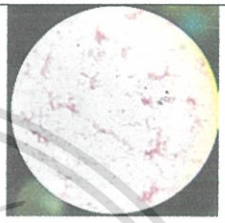
เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดลอง	ภาพลักษณะโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์
Strep. mutans	
Lb. sakei	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ
ลักษณะสัณฐานของเชื้อ *Strep. mutans* ในน้ำอ้อย

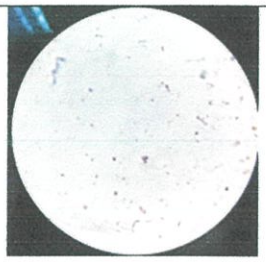
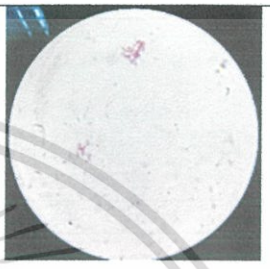
ฉ.1 ตารางแสดงลักษณะสัณฐานของเชื้อ *Strep. mutans* ในน้ำอ้อย

ลักษณะของเชื้อ *Strep. mutans* จากการสุ่มตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อทำการเก็บตัวอย่าง ทุกๆ 8 ชั่วโมง โดยเริ่มจากชั่วโมงที่ 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48 และ 56

เวลา (ชั่วโมง)	ลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์
0	
8	
16	
24	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

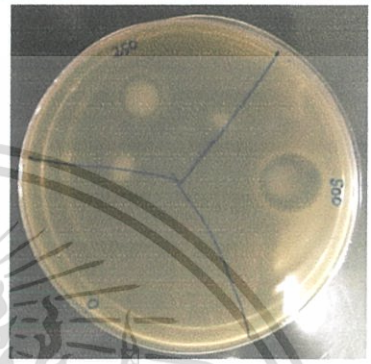
ฉ.1 ตารางแสดงลักษณะสัณฐานของเชื้อ Strep. mutans ในน้ำอ้อย (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์
32	
40	
48	
56	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช
ไนซินทางการค้ากับเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากน้ำอ้อย

ช.1 ตารางแสดงภาพความเข้มข้นไนซินที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อโซนการยับยั้งระหว่างความเข้มข้นของไนซินที่ระดับ 250 และ 500 IU/ml

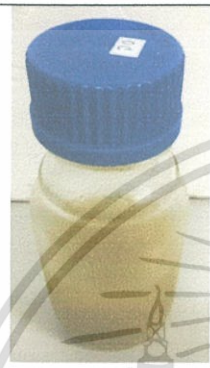
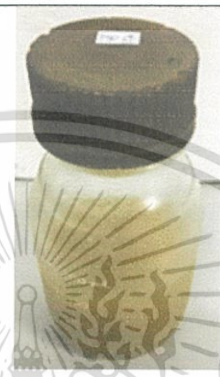
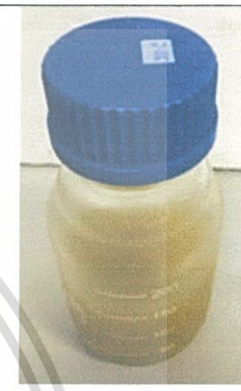
เชื้อจุลินทรีย์	โซนการยับยั้ง
Lb. sakei	
Strep. mutans	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ซ

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำอ้อย

ซ.1 น้ำอ้อยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	Control	Nisin 250 IU/ml	Nisin 500 IU/ml
0			
8			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช.1 น้ำอ้อยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ต่อ)

เวลา(ชั่วโมง)	Control	Nisin 250 IU/ml	Nisin 500 IU/ml
16			
24			
32			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซ.1 น้ำอ้อยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ต่อ)

ชั่วโมง (เวลา)	Control	Nisin250 IU/ml	Nisin500 IU/ml
40			
48			
56			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช.2 น้ำอ้อยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	Control	Nisin 250 IU/ml	Nisin 500 IU/ml
0			
8			
16			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซ.2 น้ำอ้อยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	Control	Nisin 250 IU/ml	Nisin 500 IU/ml
24			
32			
40			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซ.2 น้ำอ้อยที่เก็บรักษาทีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	Control	Nisin 250 IU/ml	Nisin 500 IU/ml
48			
56			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	พีรดา ลายลักษณ์
วัน เดือน ปี เกิด	25 กุมภาพันธ์ 2540
ประวัติการศึกษา	ปี 2558 จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสายน้ำผึ้ง ในพระอุปถัมภ์ฯ แผนการเรียน วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ ปี 2558 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาตรีสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	แผนก R&D บริษัทฟรีสแลนด์คัมพินา (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)

ชื่อ-นามสกุล	วิภาดา ดอนยี้
วัน เดือน ปี เกิด	9 พฤษภาคม 2539
ประวัติการศึกษา	ปี 2557 จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนพนมสารคาม (พนมอดุลวิทยา) แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ ปี 2558 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาตรีสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	แผนก R&D บริษัทสันติภาพ (ฮั่วเพ้ง) 1958 จำกัด

ชื่อ-นามสกุล	ศิริฉัตร หอมสวัสดิ์
วัน เดือน ปี เกิด	12 กุมภาพันธ์ 2540
ประวัติการศึกษา	ปี 2559 จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสตรีมารดาพิทักษ์ แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ ปี 2558 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาตรีสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	แผนก QC, QA บริษัทแดรีโฮม จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้