ผลของแหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลืองต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกและจุลินทรีย์ก่อโรค

Effect of carbon source from okara to growth of lactic acid bacteria and pathogen

กุลิสรา ไชยวัฒนานนท์
ฐิตาพร ศิริมงคล
รชดา วงศ์จารุวรวิทย์

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ผลของแหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลืองต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกและจุลินทรีย์ก่อโรค

Effect of carbon source from okara to growth of lactic acid bacteria and pathogen

จัดทำโดย

กุลิสรา ไชยวัฒนานนท์	รหัสนักศึกษา 58080083
ฐิตาพร ศิริมงคล	รหัสนักศึกษา 58080093
รชดา วงศ์จารุวรวิทย์	รหัสนักศึกษา 58080127

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....ดร.อุ..... 18 / กค / 2562

(ดร. อุมาพร ฉัตรศรีสุวรรณ)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	ผลของแหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลืองต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกและจุลินทรีย์ก่อโรค	
ชื่อนักศึกษา	กุลิสรา ไชยวัฒนานนท์	รหัสนักศึกษา 58080083
	ฐิตาพร ศิริมงคล	รหัสนักศึกษา 58080093
	รชดา วงศ์จารุวรวิทย์	รหัสนักศึกษา 58080127
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม	
พ.ศ.	2562	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. อุมาพร ฉัตรศรีสุวรรณ	

บทคัดย่อ

กากถั่วเหลืองเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง ในกากถั่วเหลืองมีคุณค่าทางโภชนาการที่เป็นประโยชน์ต่อลูกสุกรอยู่สูง แต่คาร์โบไฮเดรตที่ได้จากกากถั่วเหลืองนั้นมีโมเลกุลขนาดใหญ่และจัดเป็นสารต้านโภชนะ ในการทดลองนำกากถั่วเหลืองโดยทำการปรับสภาวะให้เป็นกรด โดยไม่ทำการฆ่าเชื้อ ปริมาณ 500 กรัม นำกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5%, 1% และ 2% (v/v) มาฉีดพ่นลงบนกากถั่วเหลือง ปริมาตร 150 มิลลิลิตรและทำการหมักทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลลัพธ์ที่ได้ไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ต่อได้ เนื่องจากตรวจไม่พบเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ทำให้กากถั่วเหลืองไม่เกิดการหมัก และกากถั่วเหลืองกลุ่มที่สองที่ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที มาแบ่งออกเป็น 5 การทดลอง โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* TISTR 001 หมักแบบมีอากาศ, *L. plantarum* TISTR 862 หมักแบบมีอากาศและไม่มีอากาศ และ *L. plantarum* TISTR 862 ร่วมกับ *B. subtilis* TISTR 001 หมักแบบมีอากาศและไม่มีอากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างกากถั่วเหลืองได้แก่ กากถั่วเหลือง, กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001 แบบมีอากาศ, กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* TISTR 862 แบบมีอากาศและไม่มีอากาศ และกากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* TISTR 862 ร่วมกับ *B. subtilis* TISTR 001 แบบมีอากาศและไม่มีอากาศ มาสกัดโดยใช้น้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล - ซัลฟิวริกค่าที่ได้คือ 0.0091 ± 0.0007 g/g, 0.0075 ± 0.0001 g/g, 0.0050 ± 0.0002 g/g, 0.0043 ± 0.0003 g/g, 0.0072 ± 0.0002 g/g และ 0.0028 ± 0.0001 g/g (DWB) ตามลำดับ การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีกรด 3, 5- ไดไนโตรซาลิซาลิกค่าที่ได้คือ 0.0018 ± 0. 0002 g/g, 0. 0031 ± 0.0013 g/g, 0.0020 ± 0.0002 g/g, 0.0019 ± 0.0001 g/g, 0.0028 ± 0.0001 g/g และ 0.0011 ± 0.0001 g/g (DWB) ตามลำดับ จำนวนโดยประมาณของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่อยู่ในสายโพลีเมอร์ (Degree polymerization DP) ค่าที่ได้คือ 5.06 ± 0.3286, 2.42 ± 0.8702, 2.50 ± 0.1710, 2.26 ± 0.0978, 2.57 ± 0.1248 และ 2.55 ± 0.0461 ตามลำดับ วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยวิธี Proximate analysis มีค่าเปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรตคือ 60.36 ± 4.7193, 45.27 ± 3.6997, 48.41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

± 6.2389, 58.41 ± 4.1027, 46.95 ± 2.1135 และ 45.84 ± 12.8032 % ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้สารสกัดจากกากถั่วเหลือง, กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001 แบบมีอากาศ, กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* TISTR 862 แบบมีอากาศและไม่มีอากาศ, กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 แบบมีอากาศและไม่มีอากาศ, น้ำตาลกลูโคส และปราศจากแหล่งคาร์บอน เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร Basal Medium โดยมี *L. plantarum* TISTR 862 เป็นตัวแทนเชื้อกลุ่มแล็คติกมีการเปลี่ยนแปลงจากชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งแสดงเป็นค่า Log ดังนี้ 0.8250, 0.9395, 0.9567, 0.2523, 1.2015, 0.8669, 1.4238 และ 0.2095 CFU/ml ตามลำดับแหล่งคาร์บอน และ *Escherichia coli* TISTR 073 เป็นตัวแทนเชื้อก่อโรคมีการเปลี่ยนแปลงจากชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งแสดงเป็นค่า Log ดังนี้ 0.7089, 1.0986, 1.1612, 0.5754, 1.4043, 0.7776, 1.3136 และ 0.5255 CFU/ml ตามลำดับแหล่งคาร์บอน พบว่าสารสกัดจากกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 แบบมีอากาศ ทำให้การเจริญของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862 และ *E. coli* TISTR 073 เจริญได้ดีที่สุด และเมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดมาทำการเลี้ยงร่วมกันในแหล่งคาร์บอนดังกล่าว การเจริญของ *L. plantarum* TISTR 862 มีการเปลี่ยนแปลงจากชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งแสดงเป็นค่า Log ดังนี้ 0.4260, 0.5797, 0.5571, 0.1754, 0.6989, 0.2105, 0.7157 และ 0.3383 CFU/ml ตามลำดับแหล่งคาร์บอน และการเจริญของ *E. coli* TISTR 073 มีการเปลี่ยนแปลงจากชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งแสดงเป็นค่า Log ดังนี้ 0.3986, 0.4124, 0.4053, 0.1661, 0.5061, 0.2025, 0.5106 และ 0.2904 CFU/ml ตามลำดับแหล่งคาร์บอน พบว่าสารสกัดจากกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 แบบมีอากาศ ทำให้การเจริญของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862 และ *E. coli* TISTR 073 เจริญได้ดีที่สุดเช่นกัน และพบว่าเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862 มีการเจริญที่ดีกว่าเชื้อ *E. coli* TISTR 073

คำสำคัญ: กากถั่วเหลือง *Lactobacillus plantarum* *Bacillus subtilis* *Escherichia coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Effect of carbon source from okara to growth of lactic acid bacteria and pathogen		
Student name	Kulisara	Chaiwattananon	Student ID 58080083
	Thitaphorn	Sirimongkol	Student ID 58080093
	Rachada	Wongjaruworrawit	Student ID 58080127
Program	Bachelor of science in Industrial fermentation technology		
Year	2019		
Advisor	Dr. Umarphorn Chadseesuwan		

ABSTRACT

Okara was a by-product of soymilk production. Okara have high nutritional value and more benefits so used as animal feed for piglets. But carbohydrate from okara have large molecular size and it is anti-nutritional factor causing diarrhea in piglets. This study, In the experiment, okara was used to adjust the acidity without sterilization, 500 grams and used acetic acid 150 ml. sprayed on okara and fermented with aerobic and anaerobic condition at temperature 37 °C for 48 hours. The results could not be analyzed because was not detected *L. plantarum* that were not fermented. And the second group okara that sterilized at 121 °C pressure 15 psi. for 20 min. and were divided into 5 experiments included fermented okara by *B. subtilis* TISTR 001 with aerobic condition, *L. plantarum* TISTR 862 with aerobic and anaerobic condition and *L. plantarum* TISTR 862 with *B. subtilis* TISTR 001 with aerobic and anaerobic condition at 48 hours for reduce a molecular of polysaccharide and reduce an anti - nutritional factors. Taking sample of okara, fermented okara by *B. subtilis* TISTR 001 with aerobic condition, fermented okara by *L. plantarum* TISTR 862 with aerobic and anaerobic condition and fermented okara by *L. plantarum* TISTR 862 with *B. subtilis* TISTR 001 with aerobic and anaerobic condition were extracted with distilled water at 60 °C. The amount of total sugar analyzing by phenol-sulfuric method were 0.0091 ± 0.0007 g/g, 0.0075 ± 0.0001 g/g, 0.0050 ± 0.0002 g/g, 0.0043 ± 0.0003 g/g, 0.0072 ± 0.0002 g/g and 0.0028 ± 0.0001 g/g (DWB), respectively of okara. The amount of reducing sugar analyzing by 3,5-Dinitrosalicylic acid method were 0.0018 ± 0.0002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

g/g, 0.0031 ± 0.0013 g/g, 0.0020 ± 0.0002 g/g, 0.0019 ± 0.0001 g/g, 0.0028 ± 0.0001 g/g and 0.0011 ± 0.0001 g/g (DWB), respectively of okara. The number of degree polymerization (DP) were 5.06 ± 0.3286, 2.42 ± 0.8702, 2.50 ± 0.1710, 2.26 ± 0.0978, 2.57 ± 0.1248 and 2.55 ± 0.0461, respectively of okara. Percentage of carbohydrate were 60.36 ± 4.7193, 45.27 ± 3.6997, 48.41 ± 6.2389, 58.41 ± 4.1027, 46.95 ± 2.1135 and 45.84 ± 12.8032, respectively of okara from proximate analysis method. In case study effect of carbon source from fermented okara to growth of lactic acid bacteria (*L. plantarum* TISTR 862) and pathogen (*E. coli* TISTR 073). Carbohydrate extracted from okara, all fermented okara, glucose and non-carbon source were applied in basal medium and incubated for 24 hours. The growth of *L. plantarum* TISTR 862 had change from 0 hour to 24 hours which is shown in Log as follows 0.8250, 0.9395, 0.9567, 0.2523, 1.2015, 0.8669, 1.4238 and 0.2095 CFU/ml, respectively of carbon source. And the growth of *E. coli* TISTR 073 had change from 0 hour to 24 hours which is shown in Log as follows 0.7089, 1.0986, 1.1612, 0.5754, 1.4043, 0.7776, 1.3136 and 0.5255 CFU/ml, respectively of carbon source. The result showed that carbon source from okara were fermented by *L. plantarum* TISTR 862 with *B. subtilis* TISTR 001 in aerobic state made *L. plantarum* TISTR 862 and *E. coli* TISTR 073 grew the best. The result of both bacteria group that incubated together in 24 hours were the growth of *L. plantarum* TISTR 862 had change from 0 hour to 24 hours which is shown in Log as follows 0.4260, 0.5797, 0.5571, 0.1754, 0.6989, 0.2105, 0.7157 and 0.3383 CFU/ml, respectively of carbon source and the growth of *E. coli* TISTR 073 had change from 0 hour to 24 hours which is shown in Log as follows 0.3986, 0.4124, 0.4053, 0.1661, 0.5061, 0.2025, 0.5106 and 0.2904 CFU/ml, respectively of carbon source. The result showed that carbon source from okara were fermented by *L. plantarum* TISTR 862 with *B. subtilis* TISTR 001 in aerobic state made *L. plantarum* TISTR 862 and *E. coli* TISTR 073 grew the best and the growth of *L. plantarum* TISTR 862 better than the growth of *E. coli* TISTR 073.

Keywords: Okara, *Lactobacillus plantarum, Bacillus subtilis, Escherichia coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ดร. อุมาพร ฉัตรศรีสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนแนวทางการแก้ไขปัญหาและให้ความช่วยเหลือในทุกด้านด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร. วราวุฒิ ครูส่ง และ บริษัท แลคตาซอย จำกัด สำหรับตัวอย่างกากถั่วเหลืองมาใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ และ เจ้าหน้าที่ ที่ให้ความช่วยเหลือ และ อำนวยความสะดวกในเรื่องเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณครอบครัวที่เคารพ ที่ได้ให้ความรัก ให้กำลังใจ และ คอยสนับสนุน ช่วยเหลือในทุกด้าน

ขอบคุณเพื่อนๆ รุ่นพี่ และ รุ่นน้อง ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และ เป็นกำลังใจตลอดมา

กุลิสรา ไชยวัฒนานนท์
ฐิตาพร ศิริมงคล
รชดา วงศ์จารุวรวิทย์
10 กรกฎาคม 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I - II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III - IV
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	VI – VII
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญภาพ	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 อาหารสัตว์	3
2.2 กากถั่วเหลือง	3
2.3 การหมัก (Fermentation)	6
2.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก	8
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย	12
2.6 บทความที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	16
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี	16
3.2 อุปกรณ์	17
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	19
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	26
4.1 การหมักกากถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 และ เชื้อจุลินทรีย์ที่พบหลังจากการหมัก	26
4.2 การหมักกากถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862 ทั้งสองสภาวะ และเชื้อจุลินทรีย์ที่พบหลังจากการหมัก	27
4.3 การหมักกากถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 ซึ่งเลี้ยงแบบ Mixed culture ทั้งสองสภาวะ และเชื้อจุลินทรีย์ที่พบหลังจากการหมัก	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 การศึกษาปริมาณน้ำอิสระ และสารประกอบหลักของกากถั่วเหลือง และกากถั่วเหลืองหมัก (Water activity and Proximate Analysis)..... 30

4.5 การศึกษาการสกัดน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ จำนวน DP ของตัวอย่างกากถั่วเหลือง และกากถั่วเหลืองหมัก..... 34

4.6 การศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก และจุลินทรีย์ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน..... 36

4.7 การศึกษาการเจริญร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก และจุลินทรีย์ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน..... 47

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ..... 54

บรรณานุกรม..... 56

ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 60

ภาคผนวก ข เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง..... 63

ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์..... 70

ภาคผนวก ง วิธีการเตรียมสารเคมี..... 73

ภาคผนวก จ ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง..... 75

ภาคผนวก ฉ รูปภาพประกอบ..... 100

ภาคผนวก ช วิธีการคำนวณ..... 102

ประวัติผู้เขียน..... 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่

	หน้า
2.1 ส่วนประกอบทางเคมีของกากถั่วเหลืองที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง....	5
4.1 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. ในกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001.....	26
4.2 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* sp. ในกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *L. plantarum* TISTR 862	27
4.3 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. และ *Lactobacillus* sp. ในกากถั่วเหลือง ที่หมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 ซึ่งเลี้ยงแบบ Mixed culture.....	28
4.4 การวิเคราะห์สารประกอบหลักในกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมัก.....	31
4.5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ และจำนวน DP ของตัวอย่างกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมัก.....	35
4.6.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862 โดยแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน.....	37
4.6.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *E. coli* TISTR 073 โดยแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน.....	42
4.7 การศึกษาการเจริญร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก และเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค.....	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่

หน้า

2.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 7
2.2 ลักษณะของ *L. plantarum* 9
2.3 ลักษณะของ *B. subtilis* 10
2.4 ลักษณะของ *Escherichia coli* 11
4.1 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของสารประกอบหลักในกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมัก 33
4.2 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และ เวลาของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน 39
4.3 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และเวลาของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน 40
4.4 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ Log (CFU/ml) และเวลาของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน 41
4.5 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และ เวลาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน 44
4.6 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และเวลาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน 45
4.7 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ Log (CFU/ml) และ เวลาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน 46
4.8 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และ เวลาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน 50
4.9 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และเวลาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน 51
4.10 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ Log (CFU/ml) และเวลาของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน 52
4.11 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ Log (CFU/ml) และเวลาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันกากถั่วเหลืองเป็นผลพลอยได้ที่ได้มาจากการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองของโรงงานอุตสาหกรรมน้ำนมถั่วเหลือง ซึ่งพบว่ากากถั่วเหลืองมีคุณสมบัติและคุณค่าทางโภชนาการที่ดี แต่การนำกากถั่วเหลืองดิบมาใช้ทำอาหารเลี้ยงลูกสุกรนั้นส่งผลเสียในกระบวนการย่อยของลูกสุกร เนื่องจากลูกสุกรที่เกิดมานั้นยังไม่สามารถย่อยสารต้านโภชนะที่อยู่ในกากถั่วเหลือง มีงานวิจัยพบว่าการนำกากถั่วเหลืองมาผ่านกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์จะสามารถลดสารต้านโภชนะเหล่านี้ได้ จึงมีการนำเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* TISTR 001 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 862 มาใช้ในกระบวนการหมัก ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้สามารถย่อยสลายสารต้านโภชนะประเภทคาร์โบไฮเดรต ประเภทโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) และมีรายงานว่าคาร์โบไฮเดรตประเภทโพลีแซคคาไรด์ และโอลิโกแซคคาไรด์สามารถมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก จึงได้มีการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่อาจอยู่ในมูลลูกสุกร ด้วยตัวแทนเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก (*L. plantarum* TISTR 862) และจุลินทรีย์ก่อโรค (*Escherichia coli* TISTR 073) โดยใช้แหล่งคาร์บอนของกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001, *L. plantarum* TISTR 862 และ *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 เพื่อศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 ศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตของกากถั่วเหลืองทั้งก่อนหมัก และหลังหมักด้วย *B. Subtilis* TISTR 001, *L. Plantarum* TISTR 862 และ *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862

1.2.2 ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก (*L. plantarum* TISTR 862) และจุลินทรีย์ก่อโรค (*E. coli* TISTR 073) เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. Subtilis* TISTR 001, *L. Plantarum* TISTR 862 และ *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบถึงการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกและเชื้อก่อโรค เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลืองที่หมักโดย *B. subtilis* TISTR 001, *L. plantarum* TISTR 862 และ *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862

1.3.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นประโยชน์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.3 เพิ่มแนวทางการใช้ประโยชน์จากากถั่วเหลืองที่เหลือจากอุตสาหกรรมน้ำนมถั่วเหลืองอีก ทั้งยังช่วยลดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมในการกำจัดเศษเหลือเหล่านี้ได้อีกทางหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อาหารสัตว์

อาหารสัตว์มีความสำคัญ และจำเป็นต่อการดำรงชีวิตและการเจริญเติบโตของสัตว์ อาหารของสัตว์อาจได้มาทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและหรือเกิดขึ้นจากการแปรรูปที่ได้จากพืช หรือสัตว์ เป็นสิ่งที่มีสารอาหารและเป็นประโยชน์ในการบำรุงร่างกายแก่สัตว์ ซึ่งอาหารสัตว์ส่วนมากจะได้มาจากพืช ได้แก่ มัน สำปะหลัง รำ ปลายข้าว เป็นต้น (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2558)

2.1.1 การจำแนกประเภทอาหารสัตว์แบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ

2.1.1.1 อาหารหยาบ เป็นอาหารสำคัญของสัตว์ประเภทกินหญ้าเป็นหลัก เช่นโค กระบือ แพะ แกะ มีสารอาหาร เช่น โปรตีน และพลังงานน้อยแต่มีสารย่อยยากหรือกากมาก เช่น ต้นหญ้าต่างๆ ต้นข้าวโพด ฟางข้าว ยอดอ้อย เถาถั่ว และใบพืชอื่นๆ ที่สัตว์กินได้ เช่น กระถิน ทองหลาง แคและใบมันสำปะหลัง เป็นต้น

2.1.1.2 อาหารข้น เป็นกลุ่มอาหารสัตว์ที่มีสารอาหารเป็นองค์ประกอบอยู่มาก ย่อยง่าย มีกากหรือเยื่อใยน้อย ตัวอย่างเช่น เมล็ดธัญพืชต่างๆ เมล็ดข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วลิสง หัวมัน กากถั่วต่างๆ กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน รำข้าว และปลาป่น (สารานุกรมไทย, 2556)

2.2 กากถั่วเหลือง

กากถั่วเหลือง เป็นแหล่งสำคัญของโปรตีนในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้กากถั่วเหลืองในการทำผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์นั้นมีข้อจำกัด เนื่องมาจากปัจจัยในด้านการต้านสารโภชนะ แอนติเจนของโปรตีนที่รบกวนการย่อยอาหาร การดูดซึม และการนำสารอาหารมาใช้ (Holm และ คณะ, 1992; Hong และ คณะ, 2004) การนำกากถั่วเหลืองมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับสัตว์จะต้องได้รับความร้อนที่เพียงพอ เนื่องจากกากถั่วเหลืองดิบมีสารต้านโภชนะ เช่น Trypsin inhibitor, Lectin และ B-conglycinin โดยรวมสารดังกล่าวมีผลทำให้การย่อยได้ลดลงโดยเฉพาะในสัตว์เล็ก จะแสดงอาการโตช้าลง อัตราการให้ผลผลิตลดลง มีผลทำให้การย่อยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันลดลง (Herkelma และ คณะ, 1992) อีกทั้งลูกสุกรที่มีการเปลี่ยนอาหารจากน้ำนมแม่เป็นอาหารผสมที่มีวัตถุดิบจากสัตว์และพืชจะทำให้เกิดปัญหาท้องเสียเนื่องจากระบบย่อยอาหารของลูกสุกรยังไม่สมบูรณ์ (สุวรรณา, 2544) การย่อยสลายโปรตีนแอนติบอดีส่วนใหญ่ (Glycinin และ B-Conglycinin) และ Protease inhibitors ในกากถั่วเหลืองหมักที่หมักโดย *B. subtilis* ช่วยปรับปรุงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้และกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยอาหารของสัตว์ (Feng และ คณะ, 2007) ซึ่งถั่วเหลืองหมักนั่นสามารถย่อยสลายโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตได้ และเกิดสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและละลายน้ำได้ ซึ่งจะช่วยในการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารและช่วยป้องกันโรคท้องร่วงในสัตว์ได้ นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์หมักสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ในลำไส้ที่เป็นเชื้อก่อโรค ซึ่งทำให้เกิดอาการท้องร่วงได้ (Kiers และ คณะ, 2003) การลดลงของโรคอุจจาระร่วงมีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากช่วยลดจำนวนของเชื้อก่อโรคในลำไส้ของสัตว์ลง เช่น *E. coli* (Pluske และ คณะ, 2002)

กากถั่วเหลือง เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เป็นที่นิยม เนื่องจากสามารถประหยัดและลดต้นทุนค่าใช้จ่ายสูงสำหรับผู้ประกอบการฟาร์มสัตว์ต่างๆ ในปัจจุบันไม่ว่าจะเป็นฟาร์มหมู ฟาร์มไก่ ฟาร์มวัว หรือแม้แต่กระทั่งสัตว์น้ำอย่างปลา กุ้ง เป็นต้น สิ่งที่สำคัญที่สุดก็คงเป็นอาหารสัตว์เหล่านั้น ในปัจจุบันอาหารสัตว์มีให้เลือกมากมายหลายแบบ อย่างอาหาสำเร็จรูป อาหารผสม และหนึ่งในอาหารที่เป็นที่นิยมมาก ก็คือ กากถั่วเหลือง เพราะอุดมไปด้วยโปรตีนและสารอาหารหลักต่างๆ มากมาย ทั้งยังราคาไม่แพง สามารถควบคุมต้นทุนอาหารสัตว์ได้อย่างแน่นอน โปรตีน เป็นโภชนะที่สำคัญอย่างหนึ่งสำหรับการดำรงชีวิต และการให้ผลผลิตของสัตว์ สัตว์จะได้รับโปรตีนจากอาหารหยาบ และอาหารข้น ซึ่งอาหารข้นจะเป็นอาหารที่มีโปรตีนสูง โดยเฉพาะวัตถุดิบแหล่งโปรตีนได้แก่ ปลาป่น กากถั่วเหลือง ฯลฯ กากถั่วเหลือง เป็นแหล่งโปรตีนที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้ดี เนื่องจากมีโปรตีนสูงถึง 34 เปอร์เซ็นต์ และเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพสูงมีกรดอะมิโนจำเป็น (Essential amino acid) หลายชนิด แต่มี Cystine และ Methionine ในระดับต่ำ มีฟอสฟอรัสสูง แต่มีแคลเซียม และวิตามินบีต่ำ การใช้เมล็ดถั่วเหลืองดิบเลี้ยงสัตว์ จะทำให้สัตว์ได้รับประโยชน์จากโปรตีนไม่เต็มที่ มีการเจริญเติบโตต่ำ หรือชะงักการเจริญเติบโต เมล็ดถั่วเหลืองดิบมีสารยับยั้งการใช้ประโยชน์จากโปรตีน (Trypsin Inhibitor) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ยูรีเอส (Urease enzyme) ซึ่งจะย่อยโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลืองให้สลายไปเรื่อยๆ ทำให้ปริมาณ และคุณภาพของโปรตีนลดลงในขณะที่เก็บรักษาไว้ แต่สารทั้ง 2 ชนิดนี้ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน ดังนั้น ในการนำเมล็ดถั่วเหลืองไปเลี้ยงสัตว์จึงควรนำไปทำให้สุกหรือผ่านความร้อนเสียก่อน เพื่อเป็นการลดปริมาณสาร Trypsin Inhibitor และเอนไซม์ยูรีเอส เมล็ดถั่วเหลืองที่นำมาใช้ผสมในอาหารสัตว์มี 2 ชนิดคือ กากถั่วเหลือง (Soybean meal) เป็นผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำมันพืช โดยปริมาณโปรตีนของกากถั่วเหลืองจะขึ้นอยู่กับวิธีการสกัด น้ำมัน และขนาดของเมล็ด และอีกชนิดคือ ถั่วเหลืองเอ็กซ์ทรูด หรือ ถั่วเหลืองไขมันเต็ม (Extruded soybean หรือ Full fat soybean) เป็นถั่วเหลืองที่ได้จากการนำเมล็ดถั่วเหลืองไปทำให้สุกโดยไม่มีการสกัดน้ำมันออก

2.2.1 กากถั่วเหลืองมี 2 ชนิด คือ

2.2.1.1 กากถั่วเหลืองที่มีเปลือกผสมอยู่ด้วย หรือที่เรียกกันในทางการค้าว่ากากถั่วเหลือง 44 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์คุณภาพของกากถั่วเหลืองชนิดนี้พบว่ามีโปรตีนประมาณ 47.6 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใย (Crude fiber) ประมาณ 6.6 เปอร์เซ็นต์

2.2.1.2 กากถั่วเหลืองที่ไม่มีเปลือกผสมอยู่ มีแต่เนื้อในล้วนๆ หรือที่เรียกกันในทางการค้าว่ากากถั่วเหลือง 49 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์พบว่ามีโปรตีนสูงถึง 51.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเยื่อใยต่ำกว่าชนิดที่เปลือกผสมคือ มีประมาณ 4.9 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กากถั่วเหลืองที่นำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ จะต้องมีความชื้นไม่เกิน 12 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะเป็นเกล็ด บาง เบา เมื่อใช้มือบี้จะมีลักษณะแข็ง กรอบ ไม่ดิบ หรือไหม้ ไม่มีกลิ่นหืน หรือกลิ่นสาบ และไม่มีสิ่งปลอมปน

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบทางเคมีของกากถั่วเหลืองได้มาจากกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง

ส่วนประกอบทางเคมี	ส่วนประกอบ (%) โดยน้ำหนักแห้ง
โปรตีน	31.51
ไขมัน	8.88
เยื่อใย	12.21
เถ้า	4.80
ไนโตรเจนฟรีเอ็กแทรกซ์	42.60
แคลเซียม	0.48
ฟอสฟอรัส	0.41

ที่มา: เนติยะ ยอดเณร (2555)

2.2.2 คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) คือ สารประกอบอินทรีย์ โมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตประกอบด้วยธาตุ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน มีหน่วยเล็กที่สุด คือน้ำตาลโมเลกุลเดียว (ขนิษฐา, 2559)

2.2.2.1 ชนิดของคาร์โบไฮเดรต (ขนิษฐา, 2559)

คาร์โบไฮเดรตแบ่งตามโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรต ออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

2.2.2.1.1 น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรือ โมโนแซคคาไรด์ (Monosaccharide) เป็นน้ำตาลที่เกิดจากการรวมตัวของคาร์บอนตั้งแต่ 3 ตัวถึง 6 ตัว น้ำตาลกลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่มของคาร์โบไฮเดรตที่ให้รสหวาน สูตรโมเลกุลคือ $C_nH_{2n}O_n$ เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีขนาดโมเลกุลเล็กที่สุด เมื่อรับประทานเข้าไปสามารถ ร่างกายสามารถดูดซึมแล้วนำไปใช้ได้เลยโดยไม่ต้องย่อยอีก พบมากที่สุด มี 3 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโทส และน้ำตาลกาแลกโตส

2.2.2.1.2 น้ำตาลโมเลกุลคู่ หรือ ไดแซคคาไรด์ (Disaccharide) จัดอยู่ในกลุ่มของคาร์โบไฮเดรตที่ให้รสหวาน เป็นคาร์โบไฮเดรตที่เกิดโมโนแซคคาไรด์ 2 โมเลกุล มารวมตัวกัน คาร์โบไฮเดรตประเภทนี้ที่สำคัญคือ น้ำตาลซูโครสหรือน้ำตาลทราย น้ำตาลมอลโทส และน้ำตาลแล็กโทส มีความสามารถในการละลายน้ำต่างกันไป คือ น้ำตาลซูโครสละลายน้ำได้ดี น้ำตาลมอลโทสละลายน้ำได้ค่อนข้างดี ส่วนน้ำตาลแล็กโทสละลายน้ำได้เล็กน้อย

2.2.2.1.3 โอลิโกแซกคาไรด์ (oligosaccharide) เป็นคาร์โบไฮเดรตที่เกิดจากโมโนแซคคาไรด์ 2–10 หน่วย มาเชื่อต่อกันด้วยพันธะ C–O–C ซึ่งเรียกว่าพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้าประกอบด้วย 2 หน่วยเรียกว่าไดแซกคาไรด์ (disaccharide) ถ้า 3 หน่วย เรียกว่าไตรแซกคาไรด์ (trisaccharide) ตัวอย่างของโอลิโกแซกคาไรด์ ได้แก่ แรฟฟิโนส (raffinose) และ สแตซิโอส (stachyose) เป็นต้น

2.2.2.1.4 น้ำตาลโมเลกุลใหญ่ หรือเรียกว่าพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharide) จัดอยู่ในกลุ่มของคาร์โบไฮเดรตที่ไม่มีรสหวาน เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลใหญ่และซับซ้อน จำพวกพอลิเมอร์ที่เกิดจากโมเลกุลโมโนแซคคาไรด์จำนวนมากมายต่อรวมกัน เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุด พบในธรรมชาติ เช่น แป้ง ไกลโคเจน เซลลูโลส ซึ่งน้ำตาลโมเลกุลใหญ่นี้จะไม่ละลายน้ำ

2.3 การหมัก (Fermentation)

การหมักเป็นกระบวนทางชีวเคมีภายในเซลล์ เพื่อสร้างพลังงานจากการย่อยสลายสารอินทรีย์หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ด้วยเอนไซม์ โดยมีสารอินทรีย์เป็นทั้งตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่งต่างจากการหายใจแบบใช้ออกซิเจนที่ใช้ออกซิเจนที่เป็นสารอนินทรีย์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2558)

2.3.1 แบ่งตามความต้องการอากาศหรือออกซิเจน (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2558)

2.3.1.1 Aerobic fermentation เป็นการหมักที่ต้องการอากาศ เช่น การหมักกรดซิตริก และกรดน้ำส้ม เป็นต้น

2.3.1.2 Anaerobic fermentation เป็นการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจน เช่น การหมักอะซิโตน และบิวทานอล

2.3.2 แบ่งตามสภาพการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ

2.3.2.1 Septic fermentation เป็นการหมักในสภาพเปิด ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

2.3.2.2 Semi-septic fermentation เป็นการหมักในสภาพปิดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจากภายนอก แต่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ

2.3.2.3 Aseptic fermentation เป็นการหมักในสภาพปิดที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อทั้งหมด

2.3.3 แบ่งตามลักษณะหรือปริมาณน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.3.1 การหมักบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation)

2.3.3.2 Submerge state fermentation เป็นการหมักที่ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีลักษณะเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 แบ่งตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้

2.3.4.1 การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) ทำในระบบปิดที่มีสารอาหารเริ่มต้นปริมาณจำกัดเมื่อใส่จุลินทรีย์เพาะเลี้ยงลงไปในระบบแบบต่อเนื่องแล้วจะไม่มีการเติมสารใดๆ ลงไปอีก

2.3.4.2 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นโดยมีการเติมอาหารใหม่และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกันตลอดเวลา

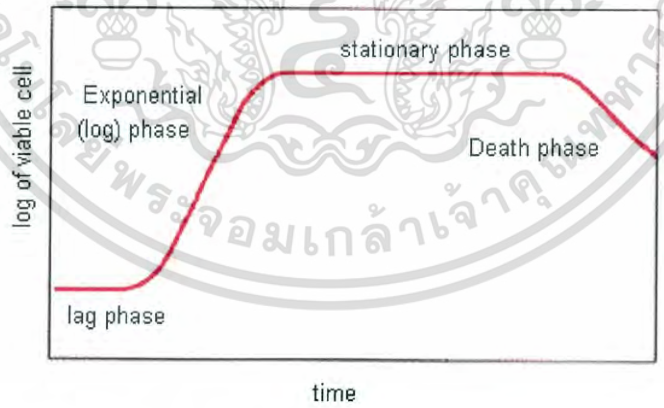
2.3.4.3 Fed-batch fermentation เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะๆ

2.3.5 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักอาหาร ใช้ได้ทั้งเชื้อที่มาจากธรรมชาติ หรืออยู่ในรูปของกล้าเชื้อ (starter) จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ เช่น รา แบคทีเรีย ยีสต์ ที่เพาะขึ้นเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักอาจมีการผสมของเชื้อหลายสายพันธุ์ หรือเป็นเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งอยู่ในรูปของเหลวหรือในรูปผง หรือเป็นก้อนที่สะดวกกับการใช้งาน ผสมกับสารอื่นเพื่อป้องกันการจับตัวเป็นก้อน (Anticaking agent)

2.3.6 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2553)

เมื่อนำแบคทีเรียจำนวนหนึ่ง ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลว แล้วจัดสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ออกซิเจน ให้เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียนั้น จะพบว่าแบคทีเรียมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น รูปแบบของการเจริญของแบคทีเรียจะเป็นไป ดังแสดงใน **ภาพที่ 2.1** ซึ่งแบ่งเป็นระยะต่างๆ ได้ 4 ระยะ ดังนี้



ภาพที่ 2.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย
ที่มา: พิมพ์เพ็ญ และคณะ (2553)

2.3.6.1 Lag phase (ระยะพัก) เป็นระยะแรกที่แบคทีเรียเริ่มพบกับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ แบคทีเรียจะปรับตัวให้เข้ากับอาหาร และสิ่งแวดล้อมนั้น มีการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสม ที่จะใช้กับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อมีการสร้างโปรตีนและส่วนประกอบอื่นๆ ที่สำคัญ ของเซลล์ ตอนระยะท้ายๆ ของระยะนี้เซลล์อาจจะมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อย และพร้อมที่จะแบ่งตัว ระยะ lag นี้อาจจะยาวนานแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการแปรรูปอาหารจะพยายามยืดช่วงนี้ไปให้ยาวนานที่สุด

2.3.6.2 Exponential หรือ log phase (ระยะแบ่งตัวทวีคูณ) เป็นระยะที่แบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด มีอัตราการแบ่งตัวคงที่ ส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์ และกระบวนการต่างๆ ตลอดจนสมบัติทางสรีรวิทยาเป็นแบบเดียวกัน

2.3.6.3 Stationary phase (ระยะคงจำนวนเซลล์) เป็นระยะที่แบคทีเรียมีจำนวนคงที่ ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก หรือคืออัตราเกิดเท่ากับอัตราตาย การที่แบคทีเรียเจริญแล้วเข้าสู่ระยะ stationary นี้เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้จะหมดลง แบคทีเรียจึงเจริญช้าลง นอกจากนี้ของเสียที่แบคทีเรียสร้างขึ้นยังยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วย

2.3.6.4 Death phase หรือ decline phase (ระยะเซลล์ตาย) เป็นระยะสุดท้าย แบคทีเรียที่มีอยู่จะตายลงมากกว่าแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะอาหารอาจหมด และมีสารพิษสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก

2.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก

2.4.1 โพรไบโอติก (Probiotic)

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์ ซึ่งได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดแล็คติก (Lactic acid bacteria, LAB) เช่น *Lactobacillus* sp. และ *Bifidobacterium* sp. แบคทีเรียกลุ่มนี้พบในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่น นมเปรี้ยว แหนม กิมจิ จะช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Pathogen) ช่วยย่อยอาหารที่มนุษย์ย่อยไม่ได้หรือย่อยได้ไม่หมด ช่วยการดูดซึมของสารอาหาร คอเรสเตอรอล และสร้างวิตามินที่เป็นประโยชน์กับร่างกาย อีกทั้งยังสามารถลดความถี่และระยะเวลาของอาการท้องร่วง ลดการติดเชื้อภายในลำไส้ และเพิ่มภูมิคุ้มกันด้วย กลไกที่เป็นไปได้คือ การทำให้ลำไส้ใหญ่มีความเป็นกรดจากการผลิตกรดแล็กติกและกรดแอซิติกที่เกิดจากกระบวนการหมักหรือใช้น้ำตาลเป็นอาหารแล้วเปลี่ยนเป็นกรด ซึ่งกรดดังกล่าวที่ผลิตขึ้นมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ อาหารที่แบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติกนำไปใช้ได้ เรียกว่า พรีไบโอติก (Prebiotic) เช่น ใยอาหาร (Dietary fiber) ประเภท Soluble fiber เช่น เพกติน กัม และโอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้แก่ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructo–Oligosaccharide) (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 เชื้อ *L. plantarum*

ภาพที่ 2.2 ลักษณะของ *L. plantarum*
ที่มา: Joan Slonczewski (2013)

L. plantarum เป็นแบคทีเรียแล็คติก รูปแท่ง แกรมบวก พบในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ ในบริเวณที่เกี่ยวกับทางเดินอาหารน้ำลายและผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 15-45 องศาเซลเซียส และที่ระดับ pH เพียง 3.2 *L. plantarum* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในการหมักน้ำตาลในการผลิตกรดแล็คติก เอทานอล หรือกรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์ ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนแบคทีเรียเหล่านี้สามารถเปลี่ยนจากการใช้วิธี Heterofermentative และ Homofermentative ของการเผาผลาญ แบคทีเรียนี้เป็นกรดและเกลือน้ำเกลือทนซึ่งช่วยให้สามารถอยู่รอดผ่านทางเดินอาหารของมนุษย์ *L. plantarum* ปัจจุบันเป็นที่สนใจของนักวิจัยและอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากนับว่าเป็นโปรไบโอติกที่ปลอดภัย สามารถช่วยจำกัดจำนวนแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคได้ซึ่งอาจส่งผลเสียต่อมนุษย์

การใช้ประโยชน์ *L. plantarum* ถูกนำมาใช้เพื่อการเก็บรักษาอาหารเพื่ออายุการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นและรสชาติเพื่อให้ได้กลิ่นหอมที่ต้องการในอาหาร *L. plantarum* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่ผลิตกรดแล็คติก ที่มีการใช้มานานสาหรับการเก็บรักษาอาหารของมนุษย์ เป็นวิธีง่ายๆ ที่ปลอดภัยที่ยังคงใช้อยู่ในหลายประเทศที่ยังไม่พัฒนา นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ที่ทาการวิจัยต่างๆ กล่าวว่าการหมักทำให้เกิดกรดแล็คติก เช่นเดียวกับที่ *L. plantarum* ใช้ เป็นวิธีที่ปลอดภัยที่สุดในการรักษาอาหาร เป็นโปรไบโอติกที่มีความหลากหลายมากที่สุด *L. plantarum* ยังเกี่ยวข้องกับการลดสารต่อต้านอนุมูลอิสระและอาหารที่ไม่พึงประสงค์ในอาหารระหว่างการหมัก (Joan Slonczewski, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 เชื้อ *B. subtilis*

ภาพที่ 2.3 ลักษณะของ *B. subtilis*
ที่มา: Hong, H. A. *et al.* (2009)

B. subtilis เป็นแบคทีเรียรูปร่างเป็นท่อน แกรมบวก เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่า ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ทนต่อความร้อน สร้างเอนโดสปอร์ โดยสปอร์จะทนต่อความร้อน ความแห้งแล้ง สารเคมี และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ดี เป็นแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนในอาหารให้เป็นกรดอะมิโน (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2558)

การนำเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในกลุ่มบาซิลลัสมาใช้ในกระบวนการหมัก จะทำให้การย่อยโปรตีนดียิ่งขึ้น และยังสามารถทำลายสารต้านโภชนะในกลุ่มโปรตีน เช่น สารยับยั้งเอนไซม์ ทริปซิน เบต้า-คอนไกลซินิน เลคตินได้ นอกจากนี้ยังทำให้โปรตีนกลายเป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง (Small peptide) หรือเป็นเปปไทด์สายสั้น มีคุณสมบัติย่อยง่าย จึงทำให้สัตว์สามารถดูดซึมสารอาหารเข้าสู่ร่างกายได้เร็วขึ้น มีค่าการละลายน้ำสูงและยังเข้าไปช่วยปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหารท้าให้จำนวนของจุลินทรีย์ดีมีมากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ก่อโรค ดังนั้นจุลินทรีย์ก่อโรคจึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Herkelman และคณะ, 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 จุลินทรีย์ที่ก่อโรค (Pathogen)

2.4.4.1 เชื้อ *E. coli*

ภาพที่ 2.4 ลักษณะของ *E. coli*

ที่มา: Rocky Mountain Laboratories, NIAD, NIH(2005)

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) รูปร่างเป็นแท่ง (Rod shape) ไม่สร้างสปอร์เป็น Facultative anaerobe เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae และเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (Coliform) ประเภท Fecal coliform ซึ่งเป็นโคลิฟอร์มที่พบในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น จึงใช้เป็นดัชนีบ่งชี้สุขลักษณะของอาหารและน้ำ

2.4.4.1.1 ชนิดของ *E. coli*

E. coli ส่วนใหญ่ไม่ใช่จุลินทรีย์ก่อโรค แต่บางชนิดที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Food poisoning) หรือเรียกว่า Enterovirulent *E. coli* group (EEC group) มี 4 ประเภทคือ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) หรือ *E. coli* 0157:H7 และ Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

2.4.4.1.2 คุณสมบัติด้านชีวเคมีและการเจริญ

E. coli มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่หลากหลายดังนั้นจึงนิยมใช้คุณสมบัตินี้เป็นหลักในการจำแนกชนิดของเชื้อ *E. coli* ออกจากเชื้อตัวอื่นๆ ในวงศ์ Enterobacteriaceae โดยทั่วไปเชื้อ *E. coli* จะสามารถเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีออกซิเจนอยู่น้อย ให้ผลการทดสอบ Catalase เป็นบวก ให้ผลการทดสอบ Oxidase เป็นลบและให้ผลการทดสอบ IMViC เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MacConkey agar (MAC) ซึ่งเป็น Differential medium จะให้โคโลนีสีชมพูหรือแดงเนื่องจากจากหมักน้ำตาลแลคโตส และ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Eosin Methylene Blue (EMB) ซึ่งเป็น Selective medium จะให้โคโลนีสีดำมีลักษณะสะท้อนแสงแววาวที่เรียกว่า Metallic sheen (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

2.5.1 สารอาหาร

2.5.1.1 แหล่งคาร์บอน (Carbon Sources) อยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และสารอินทรีย์ได้แก่คาร์โบไฮเดรท โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีเอนไซม์ ซึ่งสามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ได้ทั้ง polysaccharide น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ให้เป็นกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแล็กทิก กรดแอซีติก กรดบิวทิริก กรดโพรพิโอนิก ทำให้อาหารมีรสเปรี้ยว และมีกลิ่นเปรี้ยว และยังได้ แอซีโตน บิวทิแอลกอฮอล์ เอทิลแอลกอฮอล์ และก๊าซต่างๆ เกิดขึ้น เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน ซึ่งการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตของจุลินทรีย์อาจเป็นแบบ fermentation หรือ oxidation หรืออาจย่อยสลายได้ทั้ง 2 แบบขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตแบบ fermentation เกิดขึ้นในสภาพไม่มีออกซิเจน เช่น แบคทีเรียแล็กทิก (lactic acid bacteria) เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแล็กทิก ส่วนการย่อยสลายแบบ oxidation เกิดขึ้นในสภาพมีออกซิเจน โดยแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ (aerobic bacteria) ในกลุ่ม acetic acid bacteriaได้แก่ *Acetobacter* sp. เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแอซีติก (acetic acid)

2.5.1.2 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen sources) มีทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ แหล่งที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ โปรตีน แหล่งที่เป็นสาร อนินทรีย์ เช่น เกลือไนไตรท์ ไนเตรต หรือ แอมโมเนียม โดย *Bacillus* sp. เป็น proteolytic bacteria มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนในอาหารให้เป็นกรดอะมิโน เป็นจุลินทรีย์สาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย (microbial spoilage) ได้ และ *Lactobacillus* sp. สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส (protease) ซึ่งจะย่อยโปรตีน (protein) ให้ได้กรดอะมิโน (amino acid) โดยเฉพาะฮีสทิดีน (histidine)

2.5.1.3 แหล่งของออกซิเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส ออกซิเจนได้มาจากหลายแหล่ง เช่น น้ำ และสารอาหาร แหล่งของซัลเฟอร์อาจอยู่ในรูปของสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ ฟอสเฟตอาจอยู่ในรูปของ กรดนิวคลีอิค นิวคลีโอไทด์ ฟอสโฟลิปิด กรดไทโคอิก และสารอื่นๆ โดย *Bacillus* sp. ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) ส่วน *Lactobacillus* sp. เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe)

2.5.1.4 ไอออนของโลหะหนัก ไอออนของโลหะหนักมีความจำเป็นต่อการเจริญตามปกติของแบคทีเรีย เช่น K^+ Mg^{2+} Ca^{2+} Fe^{2+} เป็นต้น ส่วนใหญ่จุลินทรีย์ไม่ต้องการ Na^{2+} ยกเว้นแบคทีเรีย Archaebacteria ซึ่งต้องการความเค็มจัด จะไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ถ้ามีปริมาณเกลือต่ำกว่า 12 -15 %

2.5.1.5 วิตามิน แบคทีเรียต้องการวิตามินในปริมาณน้อย แต่วิตามินมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิต และการเจริญเติบโตมาก โดยทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาต่างๆ ในเซลล์จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ บางชนิดต้องการวิตามิน B1 เพื่อการเจริญเติบโต เช่น *B. anthracis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 ความต้องการออกซิเจน

2.5.2.1 แบคทีเรียที่เจริญได้ในที่มีอากาศเท่านั้น (aerobic bacteria หรือ obligate aerobe)

2.5.2.2 แบคทีเรียที่เจริญในที่ไม่มีอากาศเท่านั้น (anaerobic bacteria หรือ strict anaerobe)

2.5.2.3 แบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobic bacteria หรือ facultative anaerobe)

2.5.2.4 แบคทีเรียที่เจริญได้ดีในที่มีอากาศเล็กน้อย (microaerophile)

2.5.3 อุณหภูมิ

2.5.3.1 แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria)

2.5.3.2 แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria)

2.5.3.3 แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacteria)

2.5.4 ปริมาณน้ำ (moisture content) และวอเตอร์แอคทิวิตี้ (water activity)

2.6 บทความที่เกี่ยวข้อง

การศึกษากากถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์สำหรับสุกร เป็นผลพลอยได้จากการผลิตนมถั่วเหลือง โดยในกากถั่วเหลืองจะมีโภชนาการต่างๆ อยู่สูง เช่น คาร์โบไฮเดรต แต่คาร์โบไฮเดรตในกากถั่วเหลืองนั้นมีโมเลกุลใหญ่ คือโพลิแซคคาไรด์ และโอลิโกแซคคาไรด์ แต่เนื่องจากโพลิแซคคาไรด์ และโอลิโกแซคคาไรด์นั้นเป็นสารต้านโภชนาการ จึงมีการนำกากถั่วเหลืองสดและกากถั่วเหลืองแห้งมาผ่านกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *L. plantarum* N11 และ *L. plantarum* TISTR 862 เป็นเวลา 0, 8, 24, 40, 56 และ 72 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS จากผลการทดลองพบว่าน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์หลังจากผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนั้น มีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 1.815 และ 0.397 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ค่าดีกรีโพลิเมอไรเซชัน (DP) ที่ได้จากการสกัดคาร์โบไฮเดรตจากกากถั่วเหลืองแห้งที่หมักด้วยเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862 นั้นสามารถช่วยย่อยสลายน้ำตาลทั้งหมดให้เป็นน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเมกุลเดี่ยวในสายโพลิเมอร์ได้ดีที่สุดอีกด้วย และทำการศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งก่อนและหลังกระบวนการหมัก โดยวิธี proximate analysis จากการทดลองพบว่า กากถั่วเหลืองแห้งและกากถั่วเหลืองสดก่อนกระบวนการหมักมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากกว่าหลังกระบวนการหมัก (ณัฐกานต์ และภัคจิรา, 2559)

การศึกษาปริมาณการหมักของโอลิโกแซคคาไรด์ในส่วนผสมของอาหารหรือในอาหารเสริม ได้แก่ ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์สายยาว ราฟฟิโนส สตาชิโอส ถั่วเหลืองละลายน้ำ และของเหลวจากทรานส์กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้อุจจาระของหมูจำนวน 3 ตัวที่ไม่เคยได้รับยาปฏิชีวนะมาเป็นหัวเชื้อ นำสารตั้งต้นดังกล่าวไปหมักในหลอดทดลอง กำหนดระยะเวลาเป็น 0, 2, 4, 8 และ 12 ชั่วโมง บันทึกการเปลี่ยนแปลงของค่า pH การผลิตกรดไขมันสายสั้น (SCFA) และ การผลิตแก๊ส เมื่อครบ 12 ชั่วโมงพบว่าการผลิตแก๊สไม่มีความแตกต่างกัน ($P>0.05$) ในฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ทรานส์กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ถั่วเหลืองละลายน้ำและ ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ สำหรับอัตราการผลิตแก๊สมากสุด ($P>0.05$) เมื่อหมักด้วยราฟฟิโนส สตาชิโอส ราฟฟิโนสผสมกับสตาชิโอส และเกิดอัตราการผลิตแก๊สน้อยที่สุด ($P<0.05$) เมื่อหมักด้วยกลูโคโอลิโกแซคคาไรด์และ แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่าค่า pH ไม่มีความแตกต่างกัน ($P>0.05$) เมื่อหมักด้วยฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์และ ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ ความแตกต่างของค่า pH มีค่าสูงสุด ($P>0.05$) เมื่อหมักด้วยราฟฟิโนส สตาชิโอสและ ราฟิโนสผสมกับสตาชิโอส การผลิตกรดไขมันสายสั้น (SCFA) ไม่มีความแตกต่างกัน ($P>0.05$) เมื่อหมักด้วยฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ทรานส์กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์และ ถั่วเหลืองละลายน้ำ พบว่ามีการผลิตกรดไขมันสายสั้นจำนวนมาก ($P>0.05$) เมื่อหมักกับไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ สตาชิโอส ราฟฟิโนสผสมกับสตาชิโอส และมีอัตราการผลิตน้อย ($P>0.05$) เมื่อหมักกับราฟฟิโนสและ แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ ดังนั้นการหมักด้วยสตาชิโอสจึงให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดเพราะใช้เวลาน้อยและให้อัตราการผลิตกรดไขมันสายสั้นได้จำนวนมาก ชนิดของโอลิโกแซคคาไรด์ทั้งหมดที่นำมาศึกษาสามารถทำการหมักได้ง่าย แต่มีปริมาณและประเภทของกรดไขมันสายสั้นที่ผลิตได้แตกต่างกัน พบว่าการหมักของโอลิโกแซคคาไรด์ในถั่วเหลืองละลายน้ำมีการผลิตแก๊สมากขึ้นและมีค่า pH ที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองละลายน้ำก่อนทำการหมัก จึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าโอลิโกแซคคาไรด์ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตของการหมักภายในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ของสุกร (M. R. Smiricky-Tjardes และ คณะ, 2557)

ถั่วเหลืองอุดมไปด้วยโปรตีนแต่สารบางชนิดกลับเป็นสารยับยั้งโภชนะ (Anti-nutritional factors; ANFs) ได้แก่ ไฟเตท, แทนนิน, สารยับยั้งทริปซิน และโอลิโกแซคคาไรด์ ถั่วเหลืองถูกใช้ร่วมกับธัญพืชเป็นอาหารของสัตว์หย่านมเพื่อเสริมปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนจำเป็น ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ *L. plantarum* และเอนไซม์ที่มันผลิตเพื่อลดสารยับยั้งโภชนะและปรับปรุงสารประกอบทางโภชนะของอาหารดังกล่าว *L. plantarum* 9 สายพันธุ์ที่แยกได้จากการหมักธัญพืชโดยธรรมชาติถูกเลือกจากการผลิตเอนไซม์ alpha-galactosidase ได้เพื่อการหมักพืชตระกูลถั่วเป็นเวลา 5 วัน แล้วทำการตรวจสารยับยั้งโภชนะและเอนไซม์ alpha-galactosidase ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer พบว่าการหมักช่วยลดปริมาณแทนนินจาก 1.93 เป็น 0.12 มก./ก. ลดปริมาณไฟเตทจาก 1.16 เป็น 0.04 มก./ก. ลดปริมาณสารยับยั้งทริปซินจาก 1.20 เป็น 0.010 มก./ก. และลดปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสจาก 1.2 เป็น 0.020 มก./ก. การผลิตเอนไซม์ alpha-galactosidase ด้วย *L. plantarum* (1.8 หน่วย/มล.) ช่วยส่งเสริมการลดลงของสารดังกล่าวในขณะที่สารประกอบทางโภชนะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Adeyemo, S.M. และ Onilude, A.A.1, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารก่อภูมิแพ้และสารต้านโภชนะที่มีอยู่ในกากถั่วเหลือง โดยการนำมาหมักแบบแห้งด้วยเชื้อ *B. subtilis* ที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง หลังจากการหมักเสร็จสิ้นจะนำกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมักมาทำการสกัดโปรตีน โปรตีนที่ถูกสกัดได้จะถูกนำมาแยกโปรตีนด้วยวิธี 2D-electrophoresis และวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง Nano LC-MS/MS ซึ่งระบุได้จุดโปรตีนที่สำคัญทั้งหมด 12 จุด เช่น เบต้าคอนไกลซินิน, ไกลซินิน, สารยับยั้งเอนไซม์ทริพซิน และ ซูโครสไบน์ดิ้งโปรตีน เป็นต้น ซึ่งทั้งหมดเป็นสารก่อภูมิแพ้และสารต้านโภชนะ โดยพบว่า 70% ของเบต้าคอนไกลซินินและ 50% ของสารยับยั้งเอนไซม์ทริพซินถูกกำจัดออกไป ส่วนไกลซินินถูกกำจัดออกไปได้น้อยที่สุดคงเหลือทั้งหมด 58% โดยการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการหมักสามารถปรับปรุงคุณภาพทางโภชนาการของกากถั่วเหลือง ช่วยลดสารก่อภูมิแพ้และสารต้านโภชนะที่มีในกากถั่วเหลืองได้ (Sang-Hyun Seo และ Seong-Jun Cho, 2559)

ผลการวิเคราะห์กากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* U304 เกี่ยวกับคุณภาพทางโภชนาการ และคุณสมบัติทางชีวภาพ (bioactivity) ซึ่งจะทำการวิเคราะห์กากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* U304, *Lactobacillus spp.* และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพทางโภชนาการ และคุณสมบัติทางชีวภาพ จากการหมักกากถั่วเหลืองด้วย *B. amyloliquefaciens* U304 เชื้อมีการปรับปรุงคุณภาพทางโภชนาการและคุณสมบัติทางชีวภาพของกากถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญ โดยการกำจัดโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่เป็นสารต้านโภชนะและสารก่อภูมิแพ้ได้ ซึ่งจากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์สารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมด, เปอร์เซ็นต์ reducing power, เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเปอร์เซ็นต์สารคีเลตของกากถั่วเหลือง ซึ่งเป็นค่าอินดิเคเตอร์ของสารต้านอนุมูลอิสระนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับ 195.8 %, 201.7 %, 136.6 % และ 122.3 % ตามลำดับ จากการหมักกากถั่วเหลืองด้วย *S. cerevisiae* เชื้อสามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่เป็นสารต้านโภชนะในกากถั่วเหลืองได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนที่เป็นสารต้านโภชนะได้ และจากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์สารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมด, เปอร์เซ็นต์ reducing power, เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเปอร์เซ็นต์สารคีเลตของกากถั่วเหลือง นั้นพบว่าให้ผลไม่ต่างจากกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก ยกเว้นค่าเปอร์เซ็นต์ reducing power (160 %) และการหมักกากถั่วเหลืองด้วย *Lactobacillus spp.* เชื้อสามารถลดค่า trypsin inhibitors ลงได้ แต่ไม่สามารถลดสารต้านโภชนะตัวอื่นๆ ได้ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าจากการหมักกากถั่วเหลืองด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* U304 นั่นสามารถปรับปรุงทั้งคุณภาพทางโภชนาการ และคุณสมบัติทางชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ (Chun-Hua Chi และ Seong-Jun Cho, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ และ วิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

3.1.1.1 กากถั่วเหลืองจากอุตสาหกรรมนมถั่วเหลือง บริษัท แลคตาซอย จำกัด

3.1.1.2 เชื้อ *B. subtilis* TISTR 001

3.1.1.3 เชื้อ *L. plantarum* TISTR 862

3.1.1.4 เชื้อ *E. coli* TISTR 073

3.1.2 สารเคมี

Media

3,5- Dinitrosalicylic acid (DNS), Sigma, China

Agar, TMMEDIA, India

Beef extract, Scharlau, Barcelona

Calcium carbonate, Industry, China

EMB Agar, Levine, HiMedia, India

Glucose, CARLO EBRA, Italy

MRS agar, HiMedia, India

MRS Broth, HiMedia, India

NaCl, CARLO, Italy

Phenol, Merck, Germany

Sulfuric acid, Sigma, China

Sodium hydroxide, Ajax Finechem, Australia

Sodium Potassium Tartrate, AR, Thailand

Sulfuric acid, CARLO EBRA, Italy

Tryptone, Merck, Germany

Yeast extract, Scharlau, Spain

Proximate analysis

Acetone, MITSUL, Singapore

Boric acid, AR, United State of America

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Copper Sulfate, AR, Belgium

Hydrochloric acid, Fluka, Netherlands

Methyl green, Ajax Finechem, Australia

Methyl red, Ajax Finechem, Australia

Methylene Blue

n- Octanal, Sigma, China

Petroleum ether, Merck, Germany

Potassium sulfate, AR, Belgium

Sodium hydroxide, Merck, Germany

Sulfuric acid, CARLO EBRA, Italy

3.2 อุปกรณ์

กระบอกตวงขนาด 100 500 และ 1000 มิลลิลิตร (Cylinder)

บีกเกอร์ขนาด 250 500 600 และ 1000 มิลลิลิตร (Beaker)

ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร (Flask)

แท่งแก้ว 6 และ 12 นิ้ว (Stirring rod)

คิวเวตแก้ว (Cuvette)

ปิเปตขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร (Pipette)

ไมโครปิเปต (Micropipette)

ขวดเอ็ม (M bottle)

จานเพาะเชื้อ (Plate)

หลอดทดลองขนาด 16x150

หลอดทดลองขนาด 16x150 แบบฝาเกลียว

ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 500 และ 1000 มิลลิลิตร (Volume)

หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 25 และ 50 มิลลิลิตร

กรวยแก้ว (Funnel)

บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร (Burette)

ลูปเขี่ยเชื้อ และ เข็มเขี่ยเชื้อ (Loop and Needle)

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance)

ตู้ดูดควัน (Hood)

เครื่องกลั่นระเหยสาร สุญญากาศ (Evaporator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวด evaporator

ขวดรับสาร evaporator

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge)

เครื่องวัดค่าน้ำอิสระ (Water Activity Meter)

เครื่องอบแห้งแบบถาด (Tray dryer)

เครื่องปั่นของแห้ง

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator)

หม้อนึ่งอัดไปน้ำ (Autoclave)

เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)

เครื่องวัดอุณหภูมิ (Thermometer)

ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (Incubator)

เครื่องวัดค่ากรด-ด่าง (pH meter)

เครื่องตีปั่น (Stomacher)

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow Clean Bench)

ตู้แช่เยือกแข็ง (Freezer)

ตู้เย็น (Refrigerator) หรือ ห้องเย็น (Cold room)

ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

ถ้วยอลูมิเนียม (Can)

โถดูดความชื้น (Desiccator)

ที่คีบ (Tong)

ถ้วยกระเบื้อง (Crucible)

เตาเผาไฟฟ้า (Muffle furnace)

เตาไฟฟ้า (Hot plate)

หลอดย่อยโปรตีน (Kjeldahl Flask)

บีกเกอร์ไขมัน

หลอดกระดาษกรอง (Thimble)

ลูกแก้ว (Boiling chip)

เครื่องวิเคราะห์ใยอาหาร (Fiber Extraction apparatus)

ชุดสกัด (Soxhlet apparatus)

ชุดวิเคราะห์โปรตีน (Kjeldahl apparatus)

เครื่องย่อยโปรตีน (Protein distillation)

เครื่องกลั่นไนโตรเจน (Nitrogen Heating Box)

เครื่องสกัดไขมัน (Fat Extraction)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมกากถั่วเหลือง

ทำการแบ่งกากถั่วเหลืองออกเป็นสองกลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็นกากถั่วเหลืองที่นำมาปรับพีเอชเพื่อให้เกิดการหมักตามธรรมชาติจึงสามารถนำกากถั่วเหลืองมาใช้ได้เลยโดยไม่ต้องฆ่าเชื้อ และกลุ่มที่สองเป็นกากถั่วเหลืองที่จะนำมาหมักด้วยกล้าเชื้อ จึงต้องนำกากถั่วเหลืองมาฆ่าเชื้อก่อนใช้ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001, *L. plantarum* TISTR 862 และ *E. Coli* TISTR 073 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth (LB broth), De Man Rogosa and Sharpe broth (MRS broth) และ Nutrient Broth (NB) ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในสภาวะที่ต่างกันคือ *B. subtilis* TISTR 001 จะเจริญในสภาวะที่มีอากาศ *L. plantarum* TISTR 862 จะเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ และ *E. coli* TISTR 073 ในสภาวะที่มีอากาศ

หลังจากการบ่มครบ 12 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองปริมาณ 3 มิลลิลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 600 นาโนเมตร เพื่อดูปริมาณเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงโดย LB broth ใช้ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และ MRS broth ใช้ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กล้าเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 ผสมอัตราส่วนของเชื้อต่อน้ำเกลือคือ 7×10^8 CFU/ml ต่อน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% (w/v) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร และกล้าเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862 ผสมอัตราส่วนของเชื้อต่อน้ำเกลือคือ 2.4×10^9 ต่อน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% (w/v) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ส่วนกล้าเชื้อผสมระหว่าง *B. subtilis* TISTR 001 และ *L. plantarum* TISTR 862 จะผสมอัตราส่วนของกล้าเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 เท่ากับ 3.5×10^8 CFU/ml และ *L. plantarum* TISTR 862 เท่ากับ 1.2×10^9 CFU/ml ลงในน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดหัวสเปรย์สำหรับฉีดลงในกากถั่วเหลืองจำนวน 2,000 กรัม

3.3.3 การหมักแบบแห้ง

3.3.3.1 การหมักกากถั่วเหลืองด้วยเชื้อจุลินทรีย์

นำกากถั่วเหลืองกลุ่มแรกที่ไม่ได้ทำการฆ่าเชื้อมาแบ่งออกเป็น 6 การทดลอง ทำการปรับค่าความเป็นกรดให้เหมาะสมกับการเจริญของ *L. plantarum* TISTR 862 โดยใช้กากถั่วเหลืองการทดลองละ 500 กรัม ซึ่งในแต่ละการทดลองมีรายละเอียดดังนี้

การทดลองที่ 1 นำกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5% (v/v) มาฉีดพ่นลงบนกากถั่วเหลืองโดยใช้ปริมาตรเท่ากับ 150 มิลลิลิตร ได้ค่า pH เท่ากับ 6.2 และทำการหมักในสภาวะที่มีอากาศ

การทดลองที่ 2 นำกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5% (v/v) มาฉีดพ่นลงบนกากถั่วเหลืองโดยใช้ปริมาตรเท่ากับ 150 มิลลิลิตร ได้ค่า pH เท่ากับ 6.2 และทำการหมักในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3 นำกรดอะซิติกความเข้มข้น 1% (v/v) มาฉีดพ่นลงบนกากถั่วเหลือง โดยใช้ปริมาตรเท่ากับ 150 มิลลิลิตร ได้ค่า pH เท่ากับ 5.5 และทำการหมักในสภาวะที่มีอากาศ

การทดลองที่ 4 นำกรดอะซิติกความเข้มข้น 1% (v/v) มาฉีดพ่นลงบนกากถั่วเหลือง โดยใช้ปริมาตรเท่ากับ 150 มิลลิลิตร ได้ค่า pH เท่ากับ 5.5 และทำการหมักในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

การทดลองที่ 5 นำกรดอะซิติกความเข้มข้น 2% (v/v) มาฉีดพ่นลงบนกากถั่วเหลือง โดยใช้ปริมาตรเท่ากับ 150 มิลลิลิตร ได้ค่า pH เท่ากับ 4.8 และทำการหมักในสภาวะที่มีอากาศ

การทดลองที่ 6 นำกรดอะซิติกความเข้มข้น 2% (v/v) มาฉีดพ่นลงบนกากถั่วเหลือง โดยใช้ปริมาตรเท่ากับ 150 มิลลิลิตร ได้ค่า pH เท่ากับ 4.8 และทำการหมักในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

และกากถั่วเหลืองกลุ่มที่สองที่ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที มาแบ่งออกเป็น 5 การทดลอง โดยใช้กากถั่วเหลืองการทดลองละ 2,000 กรัม ซึ่งในแต่ละการทดลองมีรายละเอียดดังนี้

การทดลองที่ 7 นำ *B. subtilis* TISTR 001 มาฉีดพ่นลงบนกากถั่วเหลืองที่ และทำการหมักในสภาวะที่มีอากาศ

การทดลองที่ 8 นำ *L. plantarum* TISTR 862 มาฉีดพ่นลงบนกากถั่วเหลือง และทำการหมักที่ในสภาวะที่มีอากาศ

การทดลองที่ 9 นำ *L. plantarum* TISTR 862 มาฉีดพ่นลงบนกากถั่วเหลือง และทำการหมักที่ในสภาวะที่มีไม่มีอากาศ

การทดลองที่ 10 นำเชื้อผสมระหว่าง *B. subtilis* TISTR 001 และ *L. plantarum* TISTR 862 มาฉีดพ่นลงบนกากถั่วเหลือง และทำการหมักในสภาวะที่มีอากาศ

การทดลองที่ 11 นำเชื้อผสมระหว่าง *B. subtilis* TISTR 001 และ *L. plantarum* TISTR 862 มาฉีดพ่นลงบนกากถั่วเหลือง และทำการหมักในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

ทำการหมักการทดลองทั้งหมดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำกากถั่วเหลืองการทดลองที่ 7 ถึง 11 ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ต่อไป โดยการทดลองที่ 1 ถึง 6 นั้นไม่นำไปวิเคราะห์ เนื่องจากตรวจไม่พบเชื้อ *L. plantarum* ทำให้กากถั่วเหลืองไม่เกิดการหมัก

3.3.4 การสกัดคาร์โบไฮเดรต

นำตัวอย่างกากถั่วเหลืองผสมกับตัวทำละลายในอัตราส่วน 1:2 ตัวทำละลายที่ใช้คือ น้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนใสที่สกัดได้ ไปวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟิวริก และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีกรด 3, 5-ไดไนโตรซาลิซาลิก (ณัฏฐณิชา และภูริชญา, 2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.3.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (บุญเทียม, 2546)

วิธีฟีนอล-กรดซัลฟิวริก

เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสโดยละลายกลูโคส 0.01 กรัมในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร สารละลายกลูโคสที่ได้จะมีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5.0 มิลลิลิตรโดยปล่อยให้กรดซัลฟิวริกไหลลงบนผิวของสารละลายในหลอดโดยตรง เพื่อให้มีการสะสมที่ดีและรวดเร็ว อย่าปล่อยให้กรดซัลฟิวริกไหลลงตามข้างหลอดและห้ามเขย่าหลอด จากนั้นตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ 10 นาทีและเขย่าให้เข้ากันนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 480 นาโนเมตร วิธีการวิเคราะห์ทำเช่นเดียวกันกับการทำกราฟมาตรฐานที่ได้กล่าวไปและสำหรับตัวควบคุมให้เตรียมโดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

3.3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (บุญเทียม, 2546)

วิธีกรด 3, 5- ไดไนโตรซาลิซาลิก

การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัมในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร สารละลายกลูโคสที่ได้จะมีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายกรด 3, 5-ไดไนโตรซาลิซาลิก หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร แช่หลอดทดลองในน้ำเดือดนาน 5 นาที และนำมาแช่ในน้ำเย็นทันที เมื่อเย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วให้เติมน้ำกลั่นลงในหลอด หลอดละ 10.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร วิธีการวิเคราะห์ทำเช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐานที่ได้กล่าวไปและสำหรับตัวควบคุมให้เตรียมโดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

3.3.5.3 การวิเคราะห์แบบประมาณ Proximate analysis (AOAC, 1995)

3.3.5.3.1 วิเคราะห์โปรตีน

ชั่งกากถั่วเหลืองหมัก 1 กรัม ตัวเร่ง 10 กรัม แล้วนำมาย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 25 มิลลิลิตร ใส่ลูกแก้ว Boiling chip 3 ลูก จากนั้นนำไปกลั่นในสภาวะเบสโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 32 เปอร์เซ็นต์ จะได้ก๊าซแอมโมเนียผ่านก๊าซแอมโมเนียลงในสารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกรดจะจับตัวกับก๊าซแอมโมเนียแล้วนำสารละลายที่ได้ไปไทเทรตกับกรด ก็จะทราบปริมาณของกรดที่ใช้ คำนวณหาปริมาตรไนโตรเจนทั้งหมดดังสมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{การคำนวณเปอร์เซ็นต์โปรตีนในอาหาร} = \frac{(A - B) \times N \times 1.4 \times 6.25}{W}$$

A = ปริมาณของสารละลายไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง

B = ปริมาณของกรดไฮโดรคลอริกที่ไตเตรทกับแบลงค์

N = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

3.3.5.3.2 วิเคราะห์ไขมัน

อบถ้วยกระเบื้อง (Crucible) พร้อมกับลูกแก้ว (Boiling chip) ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่งกากถั่วเหลืองที่บดละเอียด อบไล่ความชื้น 5–10 กรัม บันทึกน้ำหนัก และห่อด้วยกระดาษกรองใส่ในหลอดกระดาษกรอง (Thimble) จากนั้นตวงตัวทำละลายปิโตเลียมอีเทอร์ 140–180 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยกระเบื้องเข้ากับเครื่องสกัดไขมันทำการสกัดไขมันตามโปรแกรมของเครื่อง เมื่อครบเวลานำถ้วยกระเบื้องไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วนำถ้วยกระเบื้องใส่ในโถดูดความชื้นเพื่อรอให้เย็นก่อนนำไปชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไขมัน} = \frac{W_2 - W_1}{W \times 100}$$

W = น้ำหนักตัวอย่าง

W_1 = น้ำหนักของคูซิเบิลแก้วที่มีไขมันก่อนสกัด

W_2 = น้ำหนักของคูซิเบิลแก้วที่มีไขมันหลังสกัด

3.3.5.3.3 วิเคราะห์ความชื้น

อบถ้วยอลูมิเนียมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ใส่ในโถดูดความชื้นรอให้เย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก ใส่กากถั่วเหลืองที่บดแล้วลงในถ้วยอลูมิเนียม 3–5 กรัม บันทึกน้ำหนักของถ้วยอลูมิเนียมกับตัวอย่างนำเข้าไปอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง โดยเปิดฝาถ้วยอลูมิเนียม เมื่อครบเวลานำมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{((W - W_1) - (W - W_2))}{(W - W_1) \times 100}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

W = น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมเปล่า

W_1 = น้ำหนักอลูมิเนียมที่มีตัวอย่างก่อนการอบ

W_2 = น้ำหนักอลูมิเนียมที่มีตัวอย่างหลังการอบ

3.3.5.3.4 วิเคราะห์เถ้า

เผาถ้วยกระเบื้องในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงแล้วทำให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก จากนั้นชั่งกากถั่วเหลืองที่บดแล้ว 3 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเผาตัวอย่างบนเตาไฟฟ้าจนหมดควัน และนำไปเผาอุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมงขึ้นไป หรือจนกระทั่งตัวอย่างกลายเป็นเถ้าสีขาว รอให้เตาเผาเย็นลงจึงคีบถ้วยกระเบื้องออกจากเตาเผาทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักของถ้วยกระเบื้องหลังเผาและคำนวณเปอร์เซ็นต์เถ้าดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์เถ้า} = \frac{(W_2 - W)}{(W_1 - W) \times 100}$$

W = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้อง

W_1 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องกับน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

W_2 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องกับน้ำหนักเถ้าหลังเผา

3.3.5.3.5 วิเคราะห์ไฟเบอร์

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่แห้งและสกัดไขมันออกแล้ว 1 กรัม ใส่ในถ้วยชนิดทนไฟ นำถ้วยชนิดทนไฟต่อเข้ากับเครื่องวิเคราะห์ใยอาหาร ในส่วนของ Hot extraction unit ปิดล็อคให้แน่น เปิดฝาด้านบนของเครื่องเติมกรดซัลฟูริก 0.255 นอร์มัล จำนวน 150 มิลลิลิตรลงในขวดย่อยของแต่ละตัวอย่างแล้วเติม n-Octanol 2–3 หยดเพื่อป้องกันการเกินฟองล้น ลดความร้อนลงและต้มต่อเป็นเวลา 30 นาที กรองเอากรดออกล้างกากด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 30 มิลลิลิตร กรองจนแห้ง เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.313 นอร์มัล ที่อุ่นๆ ลงไป 150 มิลลิลิตร n- Octanol 2–3 หยด ให้ความร้อนจนเดือดและล้างกากที่อยู่ในถ้วยชนิดทนไฟด้วยอะซิโตน 25 มิลลิลิตร กองให้แห้งนำถ้วยชนิดทนไฟไปอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น นำไปชั่งน้ำหนักและนำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียสนานประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนักและคำนวณเปอร์เซ็นต์ใยอาหารดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของใยอาหาร} = \frac{W_1 - W_2}{W \times 100}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

W = น้ำหนักตัวอย่าง

W_1 = น้ำหนักถ้วยชนิดทนไฟและกากหลังอบแห้ง

W_2 = น้ำหนักถ้วยชนิดทนไฟและเถ้าหลังจากเผา

3.3.5.3.6 วิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต

การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในตัวอย่าง โดยทั่วไปคำนวณจากผลต่างเปอร์เซ็นต์ของปริมาณองค์ประกอบส่วนที่เป็นโปรตีน ไขมัน ใยอาหาร เถ้า และ ความชื้น

เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรต = 100 – (โปรตีน+ไขมัน+เถ้า+ใยอาหาร+ความชื้น)

3.3.6 การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

ใช้แหล่งคาร์บอนในการศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ดังนี้

1. กากถั่วเหลือง
2. กากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001 ในสภาวะที่มีอากาศ
3. กากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *L. plantarum* TISTR 862 ในสภาวะที่มีอากาศ
4. กากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *L. plantarum* TISTR 862 ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ
5. กากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 ซึ่งเลี้ยงแบบ Mixed culture ในสภาวะที่มีอากาศ
6. กากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 ซึ่งเลี้ยงแบบ Mixed culture ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ
7. น้ำตาลกลูโคส
8. ปราศจากแหล่งคาร์บอน

3.3.6.1 การศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก และจุลินทรีย์ก่อโรค

ศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยศึกษาตัวแทนเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกได้แก่ *L. plantarum* TISTR 862 โดยนำมาเลี้ยงในสูตรอาหาร Basal medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันดังข้อ 3.3.6 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ตรวจสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารแต่ละชนิด โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) วัดค่า pH และตรวจสอบการเจริญของเชื้อด้วยวิธีการนับโคโลนีในหน่วย CFU/ml ซึ่งจะตรวจสอบ *L. plantarum* TISTR 862 โดยนำมาเลี้ยงในอาหาร MRS agar ด้วยวิธี pour plate เก็บตัวอย่างมานับโคโลนีในหน่วย CFU/ml ในชั่วโมงที่ 0, 12 และ 24 เพื่อหาความสามารถในการเจริญของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862 ในอาหาร Basal medium ที่มีแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยศึกษาตัวแทนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้แก่ *E. coli* TISTR 073 โดยนำมาเลี้ยงในสูตรอาหาร Basal medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันดังข้อ 3.3.6 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีอากาศ ตรวจสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารแต่ละชนิด โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) วัดค่า pH และตรวจสอบการเจริญของเชื้อด้วยวิธีการนับโคโลนีในหน่วย CFU/ml ซึ่งจะตรวจสอบ *E. coli* TISTR 073 โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร EMB agar ด้วยวิธี spread plate เก็บตัวอย่างมานับโคโลนีในหน่วย CFU/ml ในชั่วโมงที่ 0, 12 และ 24 เพื่อหาความสามารถในการเจริญของเชื้อ *E. coli* TISTR 073 ในอาหาร Basal medium ที่มีแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน

3.3.6.2 การศึกษาการเจริญร่วมกันของจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก และจุลินทรีย์ก่อโรค

ศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยศึกษาตัวแทนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มคือ *L. plantarum* TISTR 862 และ *E. coli* TISTR 073 โดยนำเชื้อทั้งสองชนิดมาเลี้ยงร่วมกันในสูตรอาหาร Basal medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันดังข้อ 3.3.6 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ตรวจสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารแต่ละชนิดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) วัดค่า pH และตรวจสอบการเจริญของเชื้อด้วยวิธีการนับโคโลนีในหน่วย CFU/ml ซึ่งจะตรวจสอบ *L. plantarum* TISTR 862 โดยนำมาเลี้ยงในอาหาร MRS agar ด้วยวิธี pour plate และตรวจสอบ *E. coli* TISTR 073 โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร EMB agar ด้วยวิธี spread plate เก็บตัวอย่างมานับโคโลนีในหน่วย CFU/ml ในชั่วโมงที่ 0, 12 และ 24 เพื่อหาความสามารถในการเจริญของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862 และ *E. coli* TISTR 073 ในอาหาร Basal medium ที่มีแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การหมักกากถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 และเชื้อจุลินทรีย์ที่พบหลังจากการหมัก

จำนวนโดยประมาณของจุลินทรีย์ที่ใช้เริ่มต้นในการหมักของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 คือ 7×10^8 CFU/ml โดยนำเชื้อมาหมักกากถั่วเหลืองหมักที่สภาวะที่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในการตรวจหาจำนวนเชื้อ *B. subtilis* จึงทำการหาโดยวิธี pour plate ด้วยอาหาร Nutrient Agar และตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นโดยอาหาร EMB Agar เพื่อทำการตรวจหาเชื้อ *E. coli* และอาหาร SS Agar เพื่อทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* sp. ที่อาจปนเปื้อนมาได้ เมื่อนำมาเจือจางเพื่อหาจำนวนเชื้อ *B. subtilis* จะได้ผลดังแสดงใน **ตารางที่ 4.1** ซึ่งการตรวจหาเชื้อที่ปนเปื้อนบนอาหาร EMB Agar และอาหาร SS Agar ไม่พบการปนเปื้อนของ *E. coli* และ *Salmonella* sp. เนื่องมาจากเชื้อ *B. subtilis* มีคุณสมบัติที่สามารถผลิตสารเมตาบอไลท์หลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้ (Yilmaz และคณะ, 2006) ดังนั้นจึงพบแค่เชื้อ *B. subtilis*

ตารางที่ 4.1 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. ในกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001

เจือจาง	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (colony)		เฉลี่ยจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (colony)	เฉลี่ย ($\times 10^{10}$ CFU/ml)	Log (CFU/ml)
	ซ้ำ1	ซ้ำ2			
10^{-8}	143	135	139	1.39 ± 5.6569	10.1430
10^{-9}	104	128	116	11.60 ± 16.9706	11.0645
จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus* sp.					10.6038

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การหมักกากถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862 ทั้งสองสภาวะ และเชื้อจุลินทรีย์ที่พบหลังจากการหมัก

จำนวนโดยประมาณของจุลินทรีย์ที่ใช้เริ่มต้นในการหมักของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862 คือ 2.4 x 10^9 CFU/ml โดยนำเชื้อมาหมักกากถั่วเหลืองหมักในสภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในการตรวจหาจำนวนเชื้อ *L. plantarum* จึงทำการหาโดยวิธี pour plate ด้วยอาหาร MRS Agar ตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นโดยอาหาร EMB Agar เพื่อทำการตรวจหาเชื้อ *E. coli* และอาหาร SS Agar เพื่อทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* sp. ที่อาจปนเปื้อนมาได้ เมื่อนำมาเจือจางเพื่อหาจำนวนเชื้อ *L. plantarum* จะได้ผลดังแสดงใน **ตารางที่ 4.2** ซึ่งการตรวจหาเชื้อที่ปนเปื้อนบนอาหาร EMB Agar และอาหาร SS Agar ไม่พบการปนเปื้อนของ *E. coli* และ *Salmonella* sp. เนื่องจากเชื้อ *L. plantarum* สามารถผลิตกรดแล็คติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรค (Pathogen) และจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่สามารถทนกรดที่ผลิตออกมาจากเชื้อ *L. plantarum* ได้

ตารางที่ 4.2 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* sp. ในกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *L. plantarum* TISTR 862

สภาวะ	เจือจาง	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (colony)		เฉลี่ยจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (colony)	เฉลี่ย (x10^{10} CFU/ml)	Log (CFU/ml)
		ซ้ำ1	ซ้ำ2			
มีอากาศ	10^{-8}	224	231	228	2.28 ± 4.9497	10.3579
	10^{-9}	129	140	135	13.5 ± 7.7782	11.1303
		จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* sp.				10.7441
ไม่มีอากาศ	10^{-8}	189	133	161	1.61 ± 39.5980	10.2068
	10^{-9}	103	118	111	11.1 ± 10.6066	11.0453
		จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* sp.				10.6261

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การหมักกากถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 ซึ่งเลี้ยงแบบ Mixed culture ทั้งสองสภาวะ และเชื้อจุลินทรีย์ที่พบหลังจากการหมัก

จำนวนโดยประมาณของจุลินทรีย์ที่ใช้เริ่มต้นในการหมักของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 คือ 3.5×10^8 CFU/ml และ *L. plantarum* TISTR 862 คือ 1.2×10^9 CFU/ml โดยนำเชื้อมาหมักกากถั่วเหลืองหมักในสภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในการตรวจหาจำนวนเชื้อ *B. subtilis* และ *L. plantarum* จึงทำการหาโดยวิธี pour plate ด้วยอาหาร NA Agar และ MRS Agar ตามลำดับ ตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นโดยอาหาร EMB Agar เพื่อทำการตรวจหาเชื้อ *E. coli* และอาหาร SS Agar เพื่อทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* sp. ที่อาจปนเปื้อนมาได้ จะได้ผลดังแสดงใน **ตารางที่ 4.3** ซึ่งการตรวจหาเชื้อที่ปนเปื้อนบนอาหาร EMB Agar และอาหาร SS Agar ไม่พบการปนเปื้อนของ *E. coli* และ *Salmonella* sp. เนื่องจากเชื้อ *B. subtilis* ต้องการออกซิเจนเป็นจำนวนมากในการเจริญเติบโตทำให้ความเข้มข้นของออกซิเจนในระหว่างการหมักลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นผลดีต่อเชื้อ *L. plantarum* โดยเชื้อสามารถผลิตกรดแล็คติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค (Pathogen) และจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่สามารถทนกรดที่ผลิตออกมาจากเชื้อ *L. plantarum* ได้ (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2553)

ตารางที่ 4.3 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. และ *Lactobacillus* sp. ในกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 ซึ่งเลี้ยงแบบ Mixed culture

สภาวะ	จุลินทรีย์	เจือจาง	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (colony) ซ้ำ1	ซ้ำ2	เฉลี่ยจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (colony)	เฉลี่ย ($\times 10^{10}$ CFU/ml)	Log (CFU/ml)
มีอากาศ	*Bacillus* sp.	10^{-8}	217	201	209	2.09 ± 11.3137	10.3201
		10^{-9}	114	122	118	11.80 ± 5.6569	11.0719
		จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus* sp.					10.6960
	Lactobacillus sp.	10^{-8}	205	214	210	2.10 ± 6.3640	10.3222
		10^{-9}	93	86	90	9.00 ± 4.9497	10.9542
		จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* sp.					10.6382

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะ	จุลินทรีย์	เจือจาง	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (colony)		เฉลี่ยจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (colony)	เฉลี่ย ($x10^{10}$ CFU/ml)	Log (CFU/ml)
			ซ้ำ1	ซ้ำ2			
ไม่มีอากาศ	*Bacillus* sp.	10^{-8}	20	27	24	0.24 ± 4.9497	9.3802
		10^{-9}	8	3	6	0.6 ± 3.5355	9.7782
		จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus* sp.					9.5792
	Lactobacillus sp.	10^{-8}	130	118	124	1.24 ± 8.4853	10.0934
		10^{-9}	105	83	94	9.40 ± 15.5563	10.9731
		จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* sp.					10.5333

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การศึกษาปริมาณน้ำอิสระ และสารประกอบหลักของกากถั่วเหลือง และกากถั่วเหลืองหมัก (Water activity and Proximate Analysis)

เมื่อทำการหมักกากถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 ในสภาวะมีอากาศ *L. plantarum* TISTR 862 ในสภาวะมีอากาศ และไม่มีอากาศ และ *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 ซึ่งเลี้ยงแบบ Mixed culture ในสภาวะมีอากาศ และไม่มีอากาศ ด้วยอัตราส่วนของกากถั่วเหลืองต่อน้ำเกลือที่ใช้คือ 1:2 พบว่าค่าปริมาณน้ำอิสระที่ได้นั้นมีค่าดังนี้ 0.917, 0.922, 0.986, 0.929 และ 0.993 ซึ่งเป็นค่าที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้ในการเจริญได้ โดยค่าน้ำอิสระที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญได้มีค่าตั้งแต่ 0.5 เป็นต้นไป (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2554)

นำกากถั่วเหลืองที่หมักแล้วมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น เถ้า ไขมัน โปรตีน ใยอาหาร และคาร์โบไฮเดรตดังแสดงใน **ตารางที่ 4.4** พบว่าปริมาณความชื้นของกากถั่วเหลืองหมักมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกากถั่วเหลือง ปริมาณเถ้า, ไขมัน, โปรตีน, และใยอาหารของกากถั่วเหลืองหมักมีค่าลดลง เมื่อเทียบกับกากถั่วเหลือง โดยปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากก่อนการหมักมีการสเปรย์น้ำเกลือที่ผสมกับกล้าเชื้อลงไปบนกากถั่วเหลืองจึงทำให้กากถั่วเหลืองมีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้น และปริมาณเถ้า ไขมัน โปรตีน และใยอาหารที่ลดลง เนื่องจากในการหมักกากถั่วเหลืองด้วย *B. subtilis* และ *L. plantarum* เชื้อจะนำสารอาหารไปใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต ทำให้ปริมาณสารอาหารมีค่าลดลง โดย *B. subtilis* สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอส และไลเปสที่ย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีนและไขมันให้มีโมเลกุลเล็กลงและนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญได้ (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2553) เมื่อได้ผลต่างเปอร์เซ็นต์ของปริมาณองค์ประกอบส่วนที่เป็นความชื้น เถ้า ไขมัน โปรตีน และใยอาหาร นำมาวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรตในกากถั่วเหลือง ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของคาร์โบไฮเดรตที่ได้มีค่าลดลง เมื่อเทียบกับกากถั่วเหลือง ดังนั้นระหว่างการหมักของกากถั่วเหลืองเชื้อมีการเจริญจากการใช้ไขมัน โปรตีน และ คาร์โบไฮเดรต จึงทำให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์ของปริมาณองค์ประกอบของกากถั่วเหลืองหมักมีค่าลงลด

ผลการวิเคราะห์สารประกอบหลักในกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมัก โดยการวิเคราะห์แบบประมาณ Proximate analysis ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน ความชื้น ใยอาหาร และคาร์โบไฮเดรต โดยใช้การวิเคราะห์สถิติ การวิเคราะห์ความปรวนแปรทางเดียว (One-way ANOVA) จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าความชื้น ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่เถ้า และใยอาหาร พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังแสดงใน **ตารางที่ 4.4**

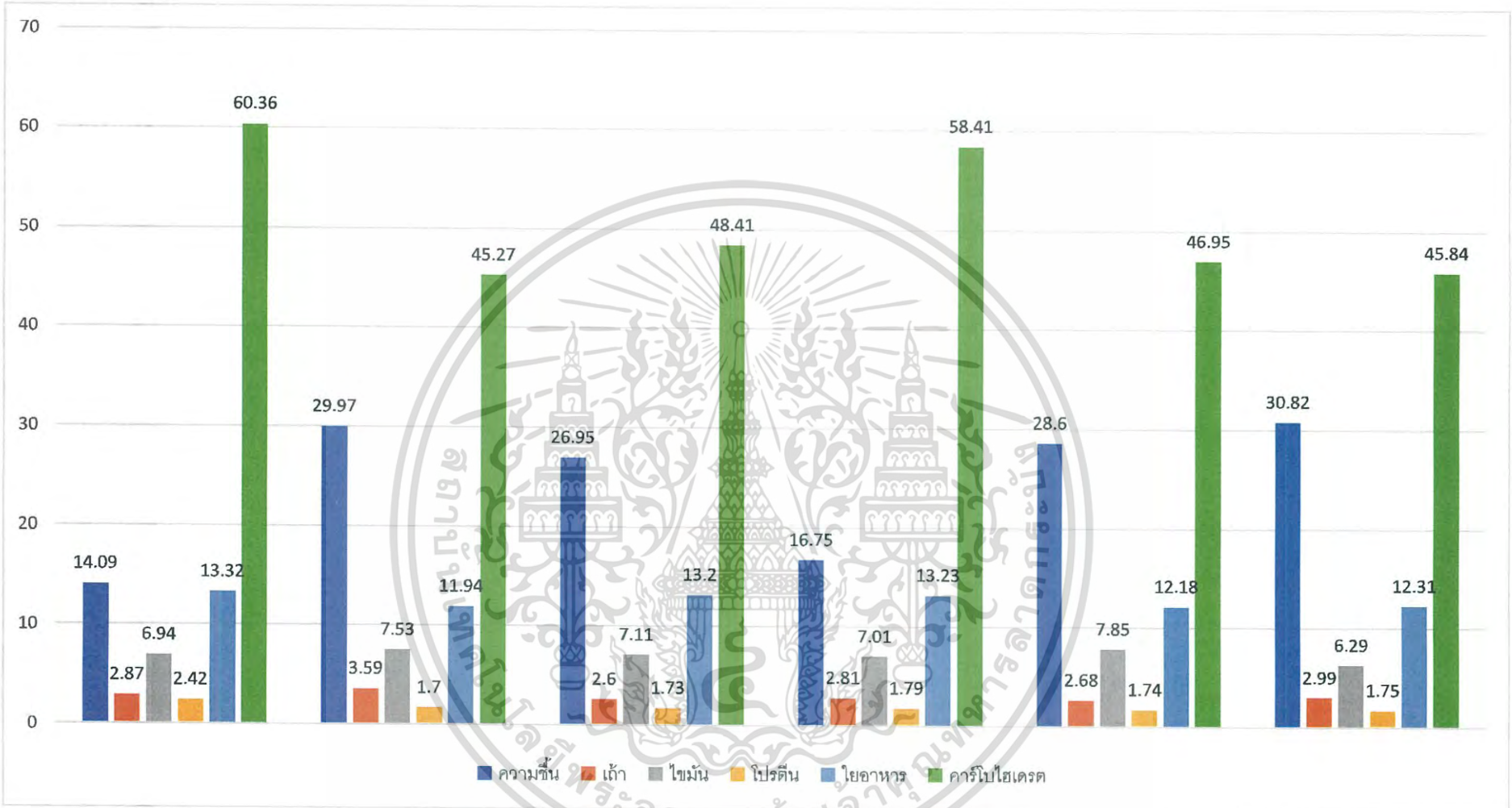
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์สารประกอบหลักในกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมัก

ตัวอย่าง	% ความชื้น	% เถ้า	% ไขมัน	% โปรตีน	% ใยอาหาร	% คาร์โบไฮเดรต
กากถั่วเหลือง	$14.09^{a} \pm 3.2436$	$2.87^{a} \pm 1.5917$	$6.94^{ab} \pm 0.6913$	$2.42^{b} \pm 0.1395$	$13.32^{a} \pm 1.3829$	$60.36^{c} \pm 4.7193$
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis*	$29.97^{b} \pm 2.5622$	$3.59^{a} \pm 0.2321$	$7.53^{ab} \pm 0.4669$	$1.70^{a} \pm 0.1062$	$11.94^{a} \pm 1.0196$	$45.27^{a} \pm 3.6997$
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	$26.95^{b} \pm 4.5754$	$2.60^{a} \pm 1.7209$	$7.11^{ab} \pm 0.6971$	$1.73^{a} \pm 0.0727$	$13.20^{a} \pm 0.5735$	$48.41^{ab} \pm 6.2389$
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	$16.75^{a} \pm 1.3881$	$2.81^{a} \pm 1.5484$	$7.01^{ab} \pm 0.4990$	$1.79^{a} \pm 0.1036$	$13.23^{a} \pm 1.7180$	$58.41^{bc} \pm 4.1027$

ตัวอย่าง	% ความชื้น	% เถ้า	% ไขมัน	% โปรตีน	% ใยอาหาร	% คาร์โบไฮเดรต
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	$28.60^{b} \pm 1.2391$	$2.68^{a} \pm 0.6298$	$7.85^{b} \pm 0.0890$	$1.74^{a} \pm 0.0612$	$12.18^{a} \pm 1.0183$	$46.95^{ab} \pm 2.1135$
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	$30.82^{b} \pm 11.4155$	$2.99^{a} \pm 0.5069$	$6.29^{a} \pm 1.4234$	$1.75^{a} \pm 0.0849$	$12.31^{a} \pm 0.7943$	$45.84^{ab} \pm 12.8032$

หมายเหตุ : $^{a-c}$ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 4.1 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของสารประกอบหลักในกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมัก (แสดงข้อมูลจาก **ตารางที่ 4.4**)

4.5 การศึกษาการสกัดน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ จำนวน DP ของตัวอย่างกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมัก

จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ และจำนวน DP จากการสกัดตัวอย่างกากถั่วเหลือง และกากถั่วเหลืองหมักดัง **ตารางที่ 4.5** พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของตัวอย่างกากถั่วเหลืองมีค่ามากที่สุด คือ 0.0091 ± 0.0007 g/g โดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 ในสภาวะมีอากาศ, *L. plantarum* TISTR 862 ในสภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ และ *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 ซึ่งเลี้ยงแบบ Mixed culture ในสภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ คือ 0.0075 ± 0.0001 g/g, 0.0050 ± 0.0002 g/g, 0.0043 ± 0.0003 g/g, 0.0072 ± 0.0002 g/g และ 0.0028 ± 0.0001 g/g ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในตัวอย่างกากถั่วเหลือง กากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 ในสภาวะมีอากาศ, *L. plantarum* TISTR 862 ในสภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ และ *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 ซึ่งเลี้ยงแบบ Mixed culture ในสภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ คือ 0.0018 ± 0.0002 g/g, 0.0031 ± 0.0013 g/g, 0.0020 ± 0.0002 g/g, 0.0019 ± 0.0001 g/g, 0.0028 ± 0.0001 g/g และ 0.0011 ± 0.0001 g/g ตามลำดับ จาก **ตารางที่ 4.5** พบว่ากากถั่วเหลืองหมัก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าลดลง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากเชื้อนำคาร์โบไฮเดรตในกากถั่วเหลืองมาใช้ ซึ่งคาร์โบไฮเดรตเป็นสารชีวโมเลกุลที่ให้พลังงานแก่องค์ประกอบของเซลล์ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโต และได้น้ำตาลโมเลกุลเล็กลง หรือน้ำตาลรีดิวซ์ (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2553) เมื่อนำปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มาคำนวณจำนวนโดยประมาณของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่อยู่ในสายโพลิเมอร์ (DP) พบว่าจำนวน DP ของกากถั่วเหลืองมากที่สุด คือ 5.06 ± 0.3286 และ จำนวน DP ของกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 ในสภาวะมีอากาศ, *L. plantarum* TISTR 862 ในสภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ และ *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 ซึ่งเลี้ยงแบบ Mixed culture ในสภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ คือ 2.42 ± 0.8702, 2.50 ± 0.1710, 2.26 ± 0.0978, 2.57 ± 0.1248 และ 2.55 ± 0.0461 ตามลำดับ

และเมื่อเปรียบเทียบผลจากการคำนวนจำนวน DP ของกากถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักพบว่าการหมักกากถั่วเหลืองด้วย *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 ในสภาวะที่มีอากาศเนื่องจากมีค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลง และมีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นมากที่สุด ส่งผลให้จำนวน DP ลดลงเนื่องจากเชื้อสามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดี

ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ และจำนวน DP ของตัวอย่างกากถั่ว เหลืองและกากถั่วเหลืองหมัก โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ การวิเคราะห์ความปรวนแปร ทางเดียว (One-way ANOVA) พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ Degree polymerization (DP) ในกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมัก มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงใน **ตารางที่ 4.5**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ และจำนวน DP ของตัวอย่างกากถั่วเหลือง และกากถั่วเหลืองหมัก

ตัวอย่างกากถั่วเหลือง	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (g/g)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/g)	Degree polymerization (DP)
กากถั่วเหลือง	$0.0091^{e} \pm 0.0007$	$0.0018^{ab} \pm 0.0002$	$5.06^{b} \pm 0.3286$
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* สภาวะมีอากาศ	$0.0075^{d} \pm 0.0001$	$0.0031^{c} \pm 0.0013$	$2.42^{a} \pm 0.8702$
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	$0.0050^{c} \pm 0.0002$	$0.0020^{ab} \pm 0.0002$	$2.50^{a} \pm 0.1710$
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	$0.0043^{b} \pm 0.0003$	$0.0019^{ab} \pm 0.0001$	$2.26^{a} \pm 0.0978$
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	$0.0072^{d} \pm 0.0002$	$0.0028^{bc} \pm 0.0001$	$2.57^{a} \pm 0.1248$
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	$0.0028^{a} \pm 0.0001$	$0.0011^{a} \pm 0.0001$	$2.55^{a} \pm 0.0461$

หมายเหตุ : $^{a\text{-}e}$ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก และจุลินทรีย์ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน

การศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกโดยใช้เชื้อ *L. plantarum* TISTR 862 และเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค *E. coli* TISTR 073 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนต่างกัน ได้แก่ แหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลือง, กากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 ในสภาวะมีอากาศ, *L. plantarum* TISTR 862 ในสภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ, *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 ซึ่งเลี้ยงแบบ Mixed culture ในสภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ, น้ำตาลกลูโคส และปราศจากแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง

จากการศึกษาการเจริญของ *L. plantarum* TISTR 862 จากแหล่งคาร์บอนต่างๆดัง **ตารางที่ 4.6.1** พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ที่ลดลง และค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มมากขึ้น การเจริญชั่วโมงที่ 24 จุลินทรีย์นั้นมีจำนวนลดลงจากชั่วโมงที่ 12 เนื่องจากแหล่งคาร์บอนและสารอาหารต่างๆ ที่อยู่ในอาหารถูกนำไปใช้ในกระบวนการหมักจนเหลือน้อยไม่เพียงพอต่อการเจริญ และจุลินทรีย์เริ่มเข้าสู่ระยะเซลล์ตาย ซึ่งมีจำนวนมากกว่าเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (พิมพ์เพ็ญ และ คณะ, 2553) เช่นเดียวกันกับการศึกษาการเจริญของ *E. coli* TISTR 073 จากแหล่งคาร์บอนต่างๆดัง **ตารางที่ 4.6.2** ที่การเจริญชั่วโมงที่ 24 จุลินทรีย์นั้นมีจำนวนลดลงจากชั่วโมงที่ 12 แต่การเปลี่ยนแปลงของค่า pH เพิ่มขึ้น และค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย

และเมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์พบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 ซึ่งเลี้ยงแบบ Mixed culture ในสภาวะมีอากาศ มีการเจริญของจุลินทรีย์ที่มากทั้งจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก *L. plantarum* TISTR 862 และจุลินทรีย์ก่อโรค *E. coli* TISTR 073 และใกล้เคียงกับการเจริญของจุลินทรีย์ในแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาก ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น น้ำตาลกลูโคส เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ทันทีทำให้มีการเจริญของจุลินทรีย์ที่มากกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น และเนื่องจากการหมักกากถั่วเหลืองด้วยจุลินทรีย์เกิดการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตได้น้ำตาลที่มีหลากหลายขนาดโมเลกุล ไม่ได้มีเพียงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเหมือนการใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคสโดยตรง การเจริญของจุลินทรีย์ในแหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลืองหมักจึงน้อยกว่าการเจริญของจุลินทรีย์ในแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก (*L. plantarum* TISTR 862) โดยแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน โดยใช้การวิเคราะห์สถิติ การวิเคราะห์ความปรวนแปรทางเดียว (One-way ANOVA) โดยการวิเคราะห์ค่า Log (CFU/ml), ค่า OD และค่า pH พบว่าค่า Log (CFU/ml), ค่า OD และค่า pH มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงใน **ตารางที่ 4.6.1**

ตารางที่ 4.6.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862 โดยแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน

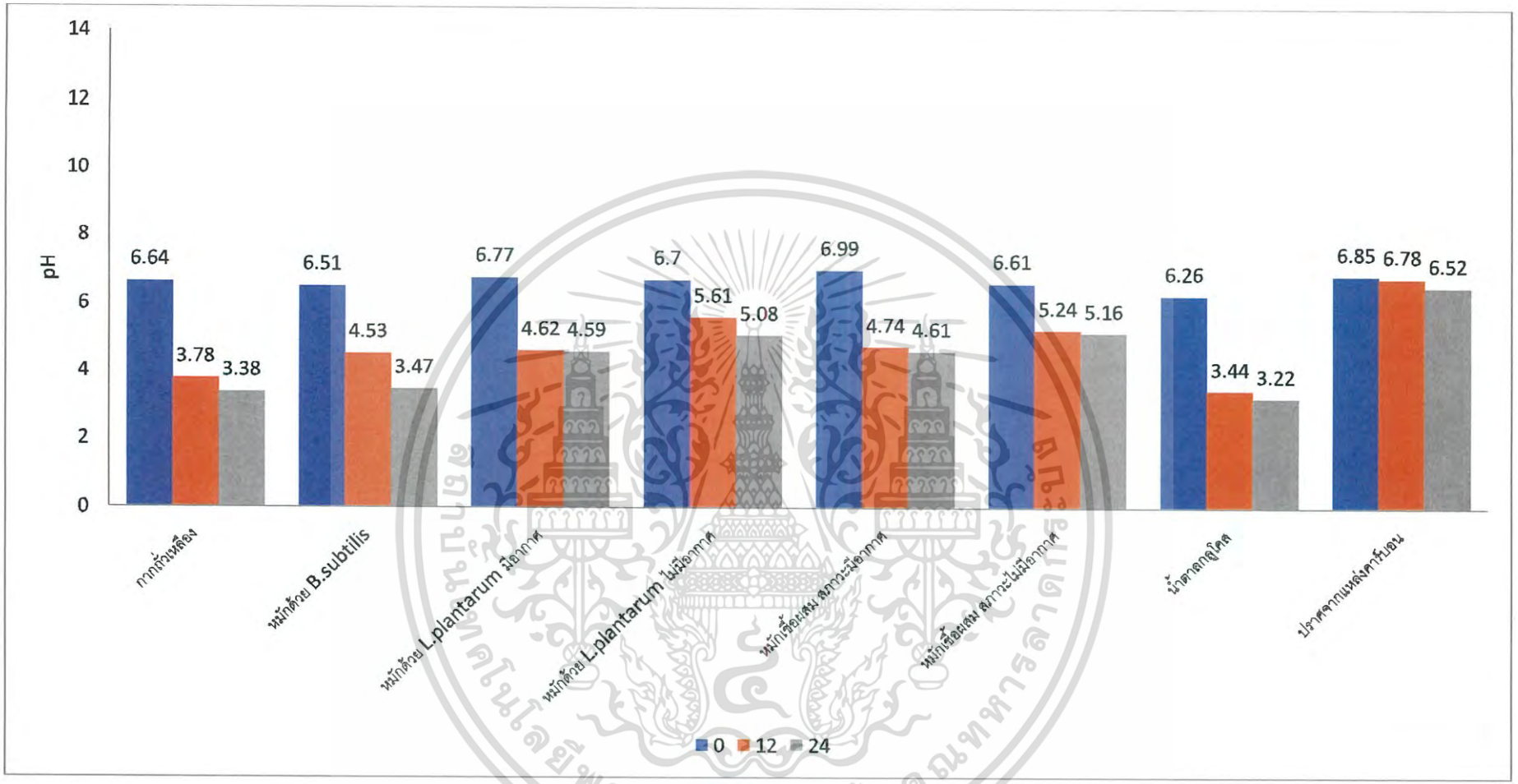
แหล่งคาร์บอน	เวลา (ชั่วโมง)	Log (CFU/ml)	ค่า OD	pH
กากถั่วเหลือง	0	7.7418 ^{a} ± 0.1255	0.029 ^{a} ± 0.0010	6.64 ^{cd} ± 0.0058
	12	8.6571 ^{c} ± 0.0571	0.703 ^{e} ± 0.0006	3.78 ^{a} ± 0.0115
	24	8.5668 ^{c} ± 0.0433	0.740 ^{e} ± 0.0006	3.38 ^{a} ± 0.0115
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		0.8250		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis*	0	7.8421 ^{a} ± 0.0625	0.024 ^{a} ± 0.0006	6.51 ^{c} ± 0.0100
	12	8.6109 ^{c} ± 0.2176	0.234 ^{ab} ± 0.0015	4.53 ^{ab} ± 0.0200
	24	8.7816 ^{cd} ± 0.2094	0.506 ^{cd} ± 0.0010	3.47 ^{a} ± 0.0173
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		0.9395		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	0	7.9496 ^{ab} ± 0.0984	0.096 ^{a} ± 0.0025	6.77 ^{cd} ± 0.0100
	12	8.8948 ^{cd} ± 0.1242	0.358 ^{bc} ± 0.0012	4.62 ^{ab} ± 0.0153
	24	8.9036 ^{d} ± 0.0408	0.442 ^{c} ± 0.0010	4.59 ^{ab} ± 0.0115
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		0.9567		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	0	7.8882 ^{ab} ± 0.1368	0.014 ^{a} ± 0.0006	6.70 ^{cd} ± 0.0115
	12	8.4708 ^{b} ± 0.4092	0.221 ^{b} ± 0.0015	5.61 ^{bc} ± 0.0058
	24	8.1405 ^{b} ± 0.0870	0.306 ^{b} ± 0.0012	5.08 ^{b} ± 0.0058
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		0.2523		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

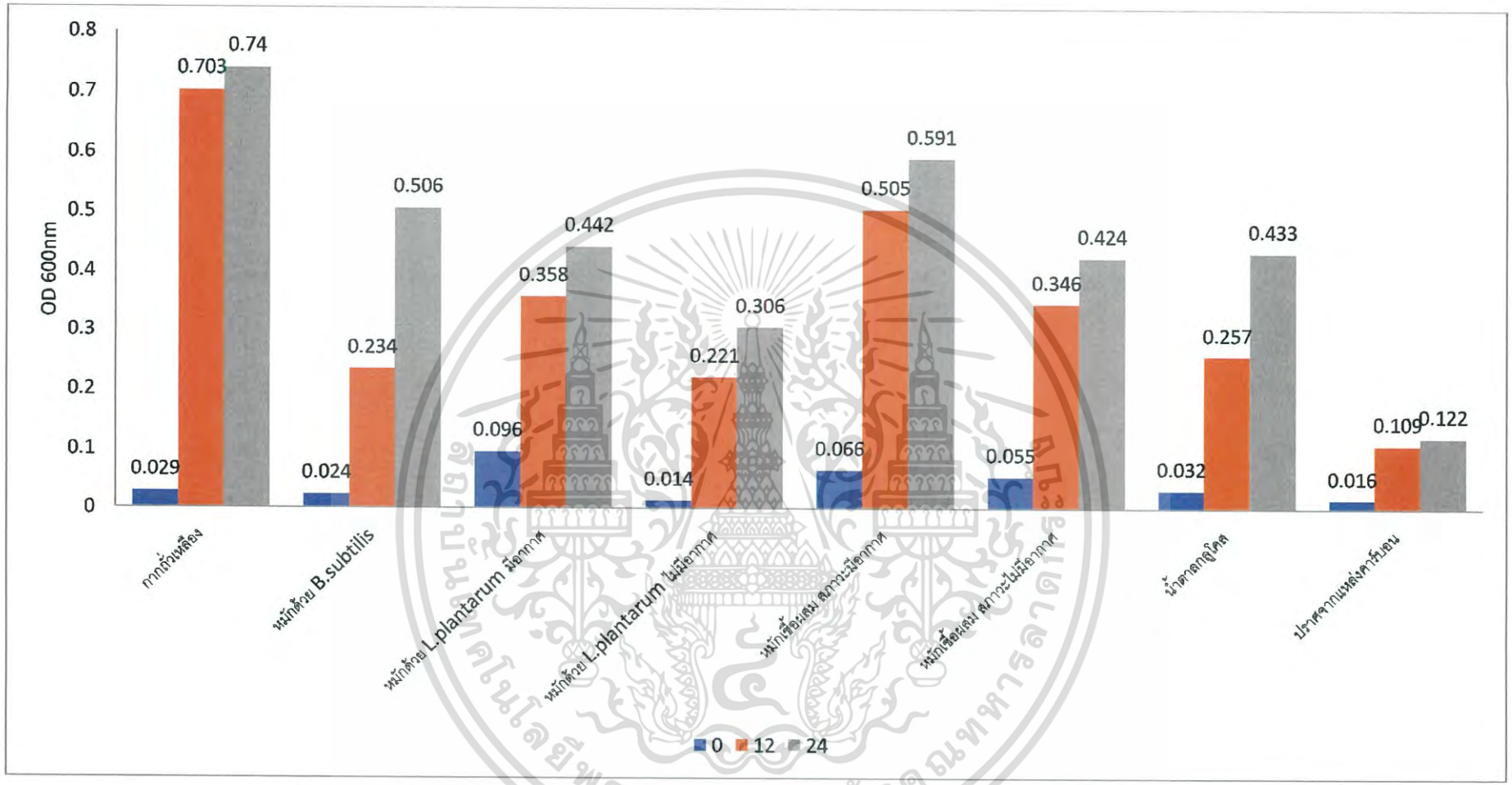
แหล่งคาร์บอน	เวลา (ชั่วโมง)	Log (CFU/ml)	ค่า OD	pH
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	0	7.7808 ^{a} ± 0.2308	0.066 ^{a} ± 0.0010	6.99 ^{d} ± 0.0058
	12	9.2282 ^{e} ± 0.0878	0.505 ^{cd} ± 0.0012	4.74 ^{ab} ± 0.0100
	24	8.9823 ^{d} ± 0.0629	0.591 ^{d} ± 0.0010	4.61 ^{ab} ± 0.0058
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		1.2015		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	0	7.6414 ^{a} ± 0.1871	0.055 ^{a} ± 0.0006	6.61 ^{cd} ± 0.0058
	12	8.5388 ^{c} ± 0.1083	0.346 ^{bc} ± 0.0015	5.24 ^{b} ± 0.0115
	24	8.5083 ^{c} ± 0.0418	0.424 ^{c} ± 0.0006	5.16 ^{b} ± 0.0058
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		0.8669		
น้ำตาลกลูโคส	0	7.6931 ^{a} ± 0.2130	0.032 ^{a} ± 0.0010	6.26 ^{c} ± 0.0100
	12	8.2590 ^{b} ± 0.0750	0.257 ^{ab} ± 0.0006	3.44 ^{a} ± 0.0058
	24	9.1168 ^{e} ± 0.0242	0.433 ^{c} ± 0.0015	3.22 ^{a} ± 0.0100
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		1.4238		
ปราศจากแหล่งคาร์บอน	0	7.7611 ^{a} ± 0.1512	0.016 ^{a} ± 0.0006	6.85 ^{d} ± 0.0058
	12	8.1208 ^{b} ± 0.0721	0.109 ^{b} ± 0.0006	6.78 ^{cd} ± 0.0100
	24	7.9706 ^{ab} ± 0.2336	0.122 ^{b} ± 0.0010	6.52 ^{c} ± 0.0153
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		0.2095		

หมายเหตุ : $^{a-e}$ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95

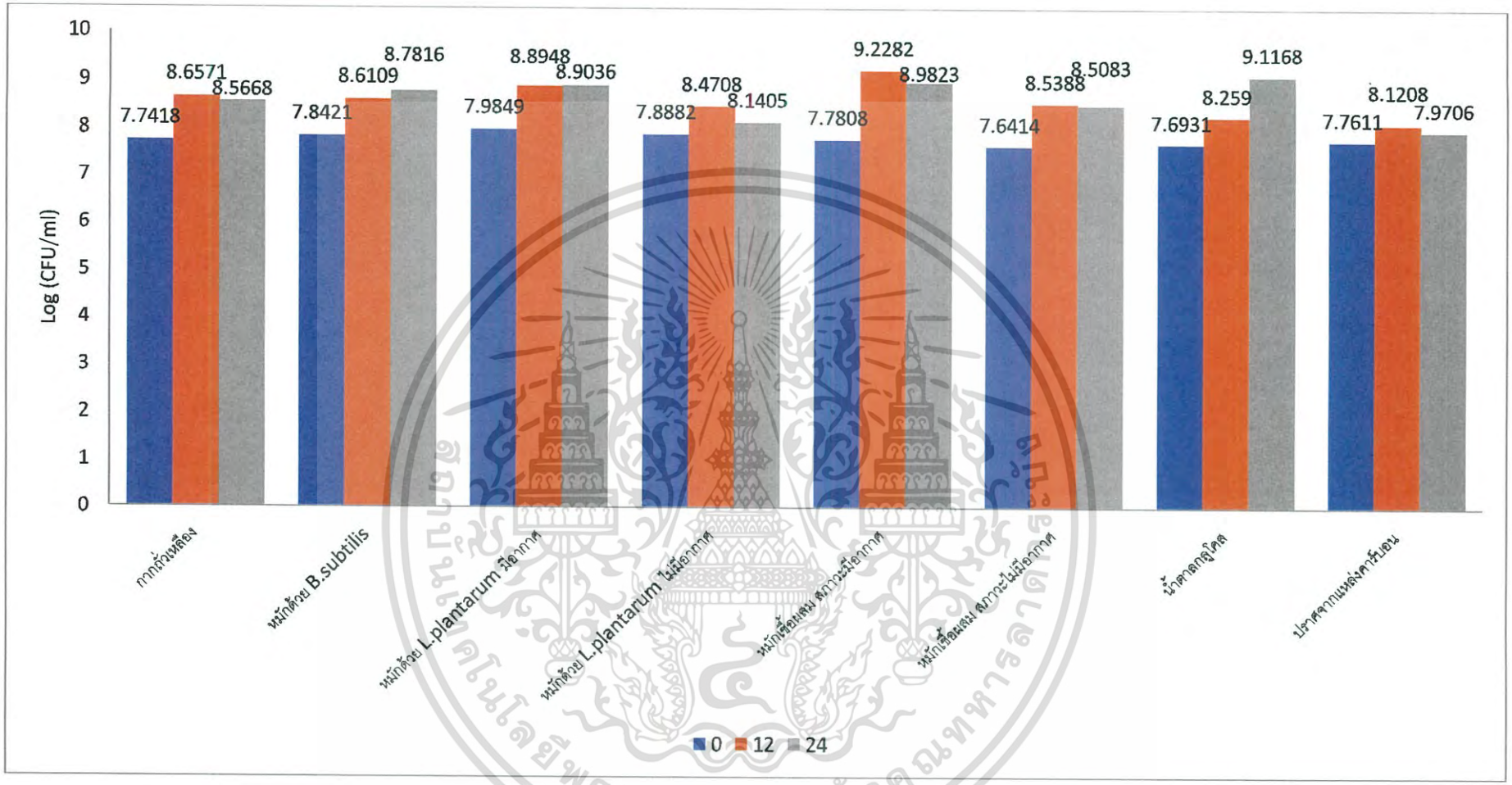
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และ เวลาของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน



ภาพที่ 4.3 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และเวลาของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน



ภาพที่ 4.4 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ Log (CFU/ml) และ เวลาของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน

ผลการวิเคราะห์การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (*E. coli* TISTR 073) โดยแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน โดยใช้การวิเคราะห์สถิติ การวิเคราะห์ความปรวนแปรทางเดียว (One-way ANOVA) โดยการวิเคราะห์ค่า Log (CFU/ml), ค่า OD และค่า pH พบว่าค่า Log (CFU/ml), ค่า OD และค่า pH มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงใน **ตารางที่ 4.6.2**

ตารางที่ 4.6.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *E. coli* TISTR 073 โดยแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน

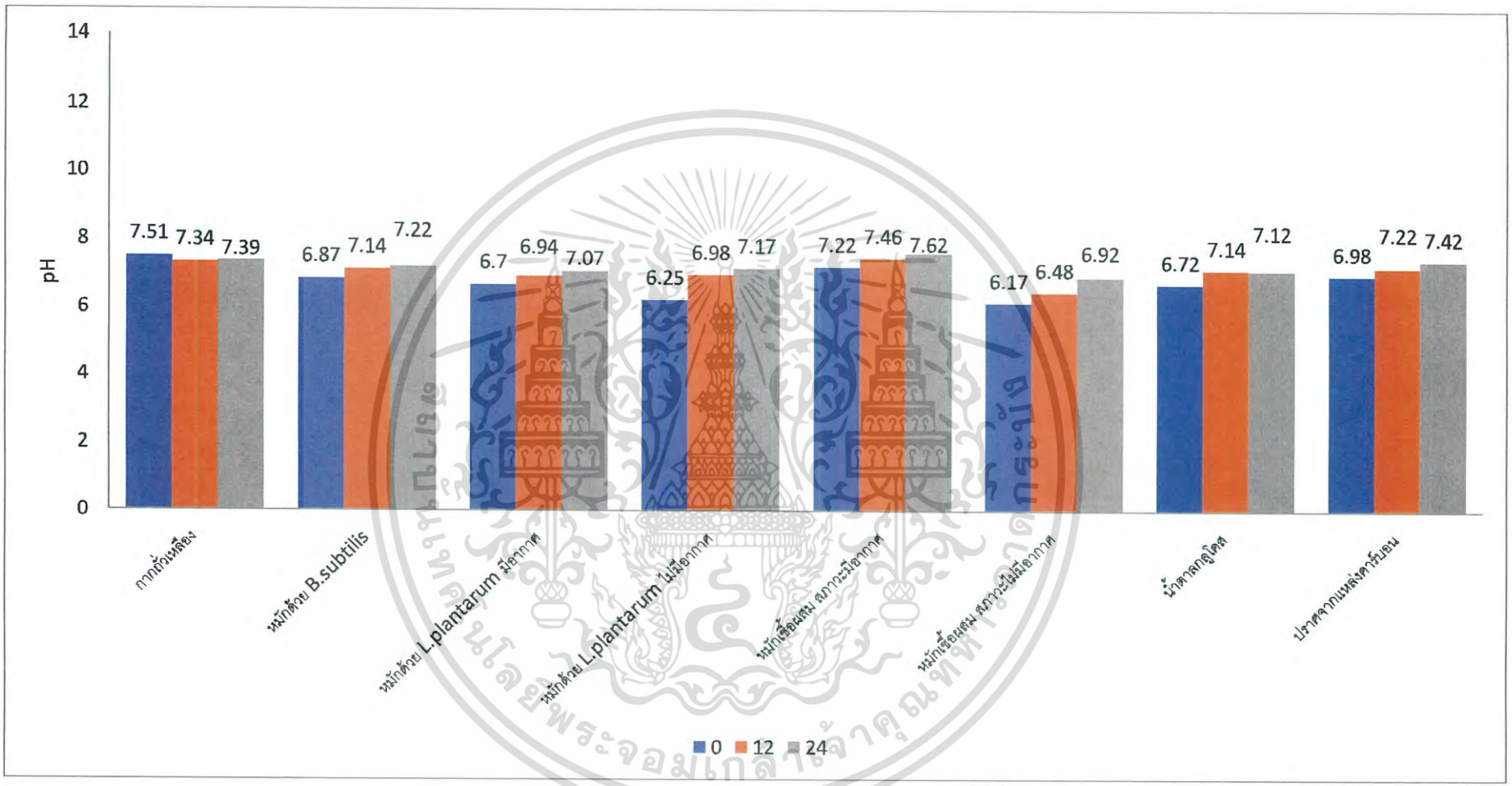
แหล่งคาร์บอน	เวลา (ชั่วโมง)	Log (CFU/ml)	ค่า OD	pH
กากถั่วเหลือง	0	$7.5604^{a} \pm 0.2413$	$0.038^{ab} \pm 0.0015$	$7.51^{cd} \pm 0.0153$
	12	$8.5477^{b} \pm 0.0259$	$0.209^{bc} \pm 0.0012$	$7.34^{c} \pm 0.0115$
	24	$8.2693^{b} \pm 0.0475$	$0.308^{c} \pm 0.0010$	$7.39^{c} \pm 0.0100$
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		0.7089		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis*	0	$7.6021^{a} \pm 0.3010$	$0.011^{ab} \pm 0.0006$	$6.87^{b} \pm 0.0208$
	12	$9.3063^{d} \pm 0.0401$	$0.222^{bc} \pm 0.0010$	$7.14^{bc} \pm 0.0115$
	24	$8.7007^{bc} \pm 0.1467$	$0.313^{c} \pm 0.0015$	$7.22^{bc} \pm 0.0058$
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		1.0986		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	0	$7.7741^{ab} \pm 0.0731$	$0.042^{ab} \pm 0.0006$	$6.70^{b} \pm 0.0058$
	12	$9.2505^{d} \pm 0.0319$	$0.383^{cd} \pm 0.0006$	$6.94^{b} \pm 0.0058$
	24	$8.9353^{c} \pm 0.0340$	$0.414^{d} \pm 0.0010$	$7.07^{bc} \pm 0.0115$
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		1.1612		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	0	$7.9331^{b} \pm 0.0796$	$0.065^{ab} \pm 0.0012$	$6.25^{ab} \pm 0.0100$
	12	$8.8978^{c} \pm 0.0818$	$0.245^{bc} \pm 0.0015$	$6.98^{b} \pm 0.0100$
	24	$8.5085^{b} \pm 0.1126$	$0.302^{c} \pm 0.0012$	$7.17^{bc} \pm 0.0231$
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		0.5754		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

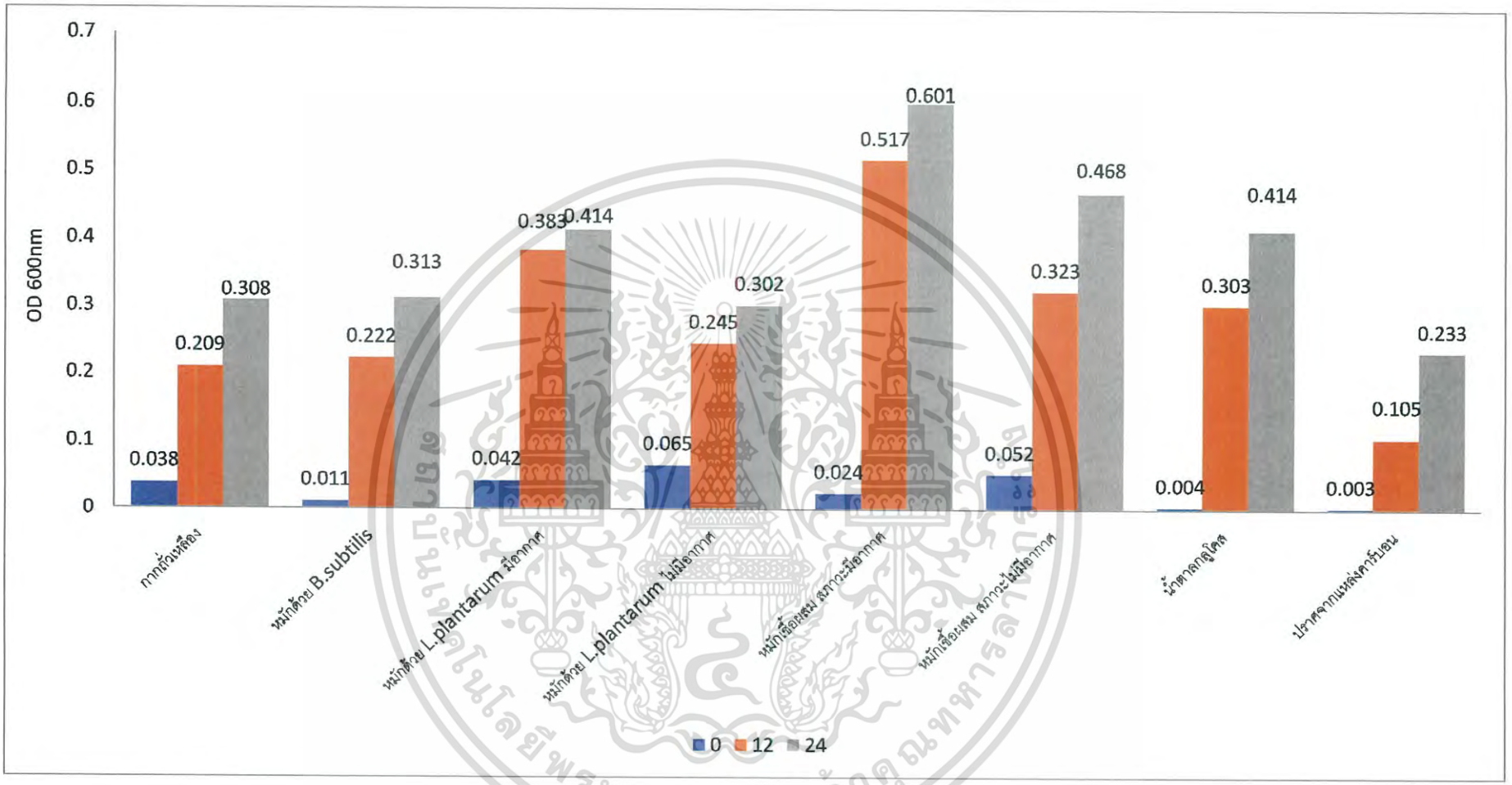
แหล่งคาร์บอน	เวลา (ชั่วโมง)	Log (CFU/ml)	ค่า OD	pH
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	0	$7.6514^{a} \pm 0.1560$	$0.024^{ab} \pm 0.0021$	$7.22^{bc} \pm 0.0200$
	12	$9.4187^{d} \pm 0.0143$	$0.517^{e} \pm 0.0010$	$7.46^{c} \pm 0.0058$
	24	$9.0557^{cd} \pm 0.0400$	$0.601^{f} \pm 0.0006$	$7.62^{d} \pm 0.0058$
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		1.4043		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	0	$7.8198^{ab} \pm 0.0721$	$0.052^{ab} \pm 0.0015$	$6.17^{a} \pm 0.0153$
	12	$8.9120^{c} \pm 0.0484$	$0.323^{c} \pm 0.0010$	$6.48^{ab} \pm 0.0115$
	24	$8.5974^{bc} \pm 0.0360$	$0.468^{d} \pm 0.0010$	$6.92^{b} \pm 0.0058$
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		0.7776		
น้ำตาลกลูโคส	0	$7.4601^{a} \pm 0.1512$	$0.004^{a} \pm 0.0015$	$6.72^{b} \pm 0.0058$
	12	$8.8199^{c} \pm 0.0483$	$0.303^{c} \pm 0.0006$	$7.14^{bc} \pm 0.0173$
	24	$8.7737^{bc} \pm 0.0511$	$0.414^{d} \pm 0.0010$	$7.12^{bc} \pm 0.0208$
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		1.3136		
ปราศจากแหล่งคาร์บอน	0	$7.7418^{ab} \pm 0.1255$	$0.003^{a} \pm 0.0015$	$6.98^{b} \pm 0.0265$
	12	$8.3647^{b} \pm 0.0652$	$0.105^{b} \pm 0.0012$	$7.22^{bc} \pm 0.0100$
	24	$8.2673^{b} \pm 0.0699$	$0.233^{bc} \pm 0.0006$	$7.42^{c} \pm 0.0058$
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์		0.5255		

หมายเหตุ : $^{a-f}$ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

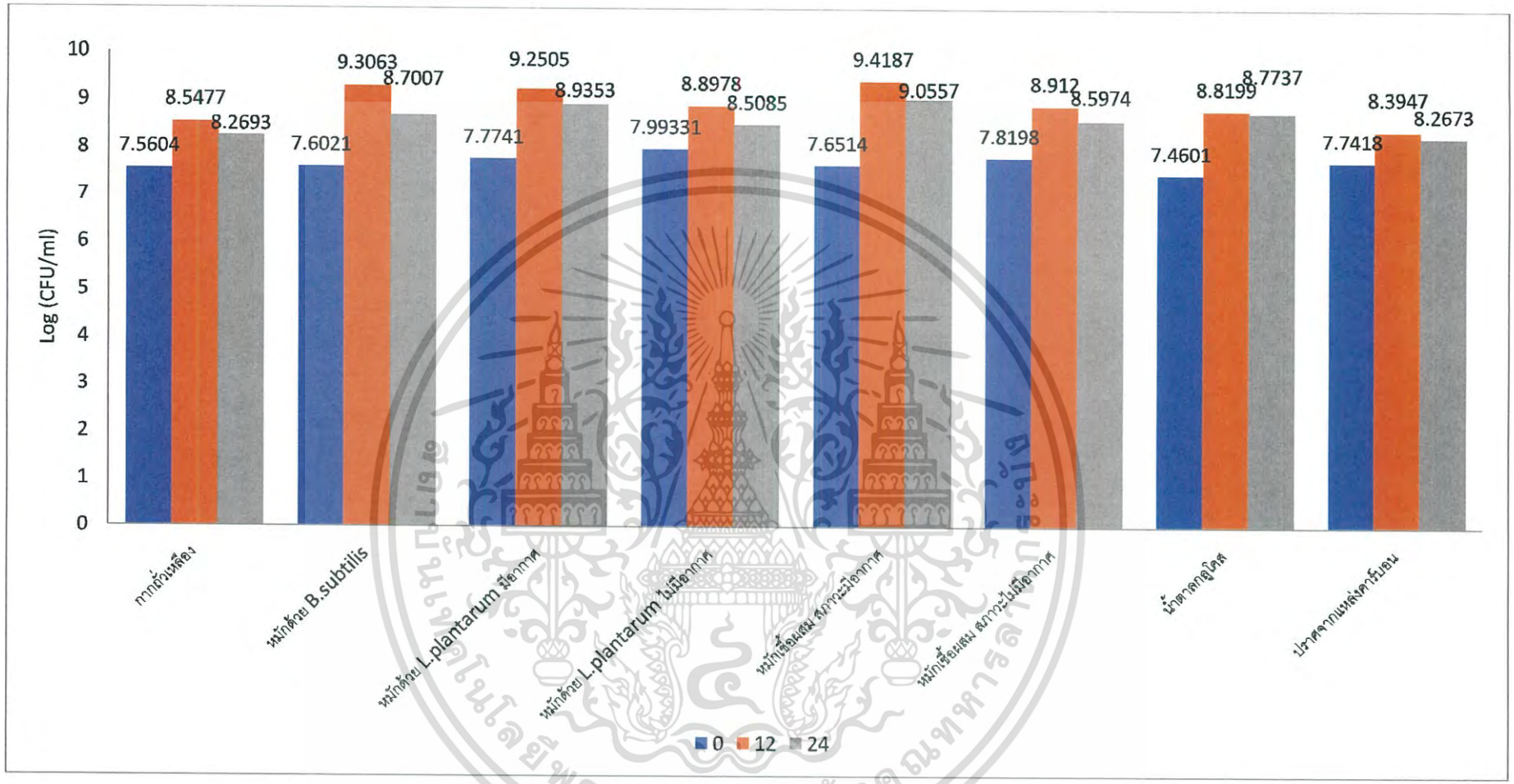
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และเวลาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน



ภาพที่ 4.6 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และเวลาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน



ภาพที่ 4.7 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ Log (CFU/ml) และเวลาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน

4.7 การศึกษาการเจริญร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก และจุลินทรีย์ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน

การศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ร่วมกันโดยศึกษาตัวแทนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มคือ เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก *L. plantarum* TISTR 862 และ เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค *E. coli* TISTR 073 โดยนำเชื้อทั้งสองชนิดมาเลี้ยงร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนต่างกัน ได้แก่ แหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลือง, กากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 ในสภาวะมีอากาศ, *L. plantarum* TISTR 862 ในสภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ, *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 ซึ่งเลี้ยงแบบ Mixed culture ในสภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ, น้ำตาลกลูโคส และปราศจากแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง

จากการศึกษาการเจริญร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มดัง **ตารางที่ 4.7** พบว่าค่า pH มีค่าลดลง หรือมีความเป็นกรดมากขึ้น โดยมีการผลิตกรดที่ได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก *L. plantarum* TISTR 862 โดยปริมาณเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก *L. plantarum* TISTR 862 สามารถเจริญได้ดีกว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค *E. coli* TISTR 073 ที่เจริญร่วมกัน อันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดที่เลี้ยงร่วมกันอาจเข้าสู่ระยะเซลล์ตายจากการขาดแหล่งคาร์บอนหรือจากการอาศัยอยู่ร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแลคติคนั้นได้มีการผลิตกรดออกมาซึ่งอาจไปยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ก่อโรค และสามารถสร้างแบคทีริโอซิน (bacteriocin) ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (พิมพ์เพ็ญ และ คณะ, 2553)

และเมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ดัง **ตารางที่ 4.7** พบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 ซึ่งเลี้ยงแบบ Mixed culture ในสภาวะมีอากาศ มีการเจริญของจุลินทรีย์ที่มากทั้งจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก *L. plantarum* TISTR 862 และจุลินทรีย์ก่อโรค *E. coli* TISTR 073 และใกล้เคียงกับการเจริญของจุลินทรีย์ในแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาก ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น น้ำตาลกลูโคส เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ทันทีทำให้มีการเจริญของจุลินทรีย์ที่มากกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น และเนื่องจากการหมักกากถั่วเหลืองด้วยจุลินทรีย์เกิดการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตได้น้ำตาลที่มีหลากหลายขนาดโมเลกุล ไม่ได้มีเพียงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเหมือนการใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคสโดยตรง การเจริญของจุลินทรีย์ในแหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลืองหมักจึงน้อยกว่าการเจริญของจุลินทรีย์ในแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส

ผลการวิเคราะห์การเจริญร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกและเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค โดยแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน โดยใช้การวิเคราะห์สถิติ การวิเคราะห์ความปรวนแปรทางเดียว (One way ANOVA) โดยการวิเคราะห์ค่า Log (CFU/ml), ค่า OD และค่า pH พบว่าค่า Log (CFU/ml) ของ *Lactobacillus* sp., ค่า Log (CFU/ml) ของ *E. coli*, ค่า OD และค่า pH มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงใน **ตารางที่ 4.7**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 การศึกษาการเจริญร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก และเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

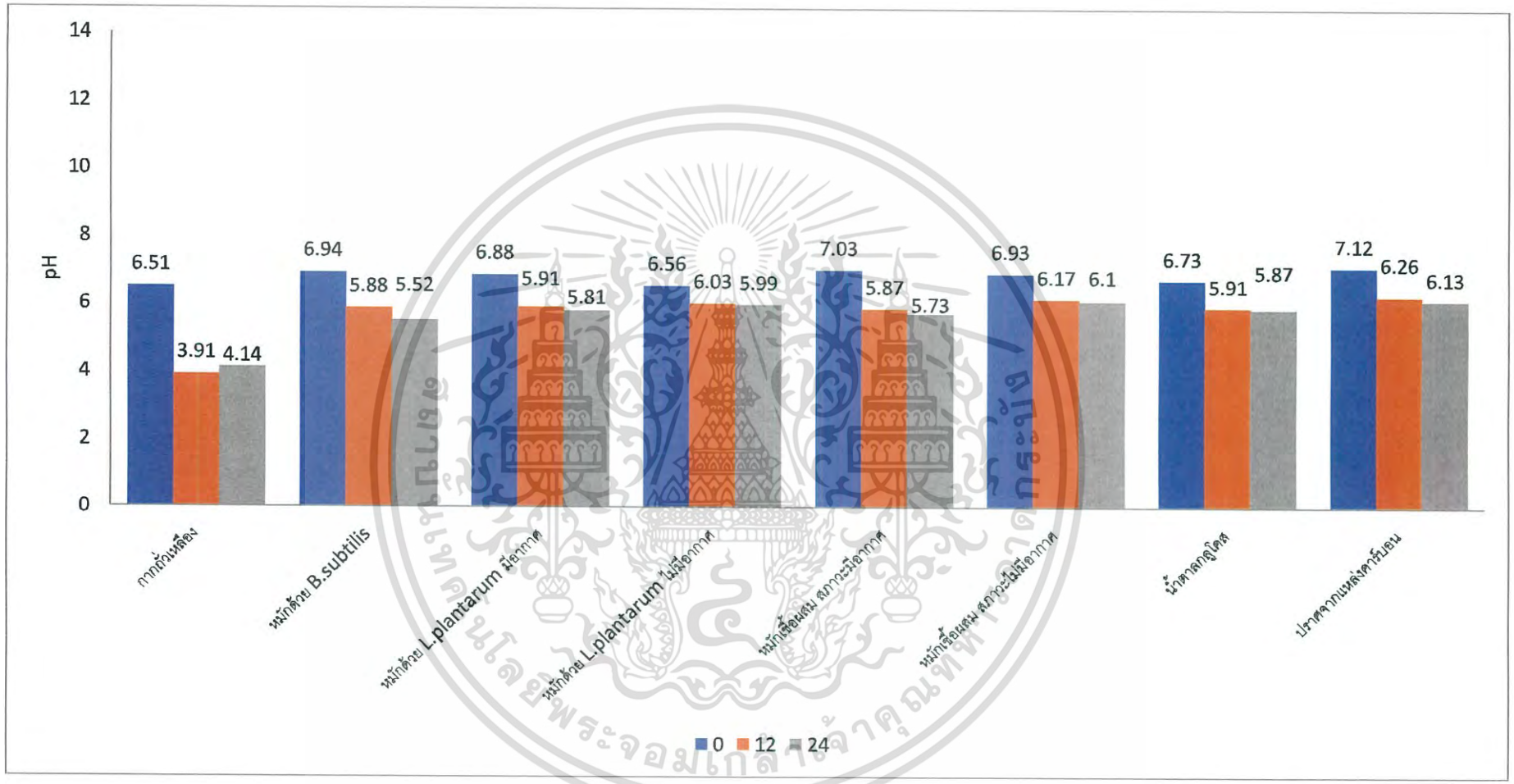
แหล่งคาร์บอน	เวลา (ชั่วโมง)	ค่า OD	pH	Log (CFU/ml)	
				L. plantarum	*E. coli*
กากถั่วเหลือง	0	0.040 ^{a} ± 0.0010	6.51 ^{cd} ± 0.0173	8.2701 ^{a} ± 0.0361	8.0922 ^{a} ± 0.1204
	12	0.391 ^{b} ± 0.0015	3.91 ^{a} ± 0.0153	9.0677 ^{d} ± 0.0260	8.9011 ^{de} ± 0.0166
	24	0.557 ^{d} ± 0.0010	4.14 ^{ab} ± 0.0058	8.6960 ^{bc} ± 0.0613	8.4908 ^{bc} ± 0.0281
	การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์			0.4260	0.3986
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis*	0	0.045 ^{a} ± 0.0012	6.94 ^{cd} ± 0.0153	8.1547 ^{a} ± 0.0457	8.1338 ^{ab} ± 0.0496
	12	0.572 ^{d} ± 0.0012	5.88 ^{bc} ± 0.0058	9.2048 ^{e} ± 0.0176	8.9939 ^{de} ± 0.0177
	24	0.631 ^{e} ± 0.0015	5.52 ^{b} ± 0.0100	8.7345 ^{bc} ± 0.0280	8.5462 ^{c} ± 0.0501
	การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์			0.5797	0.4124
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	0	0.043 ^{a} ± 0.0006	6.88 ^{cd} ± 0.0115	8.3440 ^{ab} ± 0.0813	8.1818 ^{ab} ± 0.0708
	12	0.466 ^{c} ± 0.0015	5.91 ^{bc} ± 0.0100	9.0918 ^{d} ± 0.0251	8.8991 ^{d} ± 0.0223
	24	0.526 ^{cd} ± 0.0010	5.81 ^{b} ± 0.0153	8.9011 ^{cd} ± 0.0166	8.5871 ^{c} ± 0.0173
	การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์			0.5571	0.4053
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	0	0.051 ^{a} ± 0.0010	6.56 ^{cd} ± 0.0100	8.4355 ^{ab} ± 0.0398	8.0751 ^{a} ± 0.0731
	12	0.482 ^{c} ± 0.0012	6.03 ^{c} ± 0.0153	8.9359 ^{cd} ± 0.0176	8.8217 ^{d} ± 0.0100
	24	0.542 ^{cd} ± 0.0015	5.99 ^{bc} ± 0.0153	8.6109 ^{b} ± 0.0496	8.2412 ^{b} ± 0.0889
	การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์			0.1754	0.1661

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

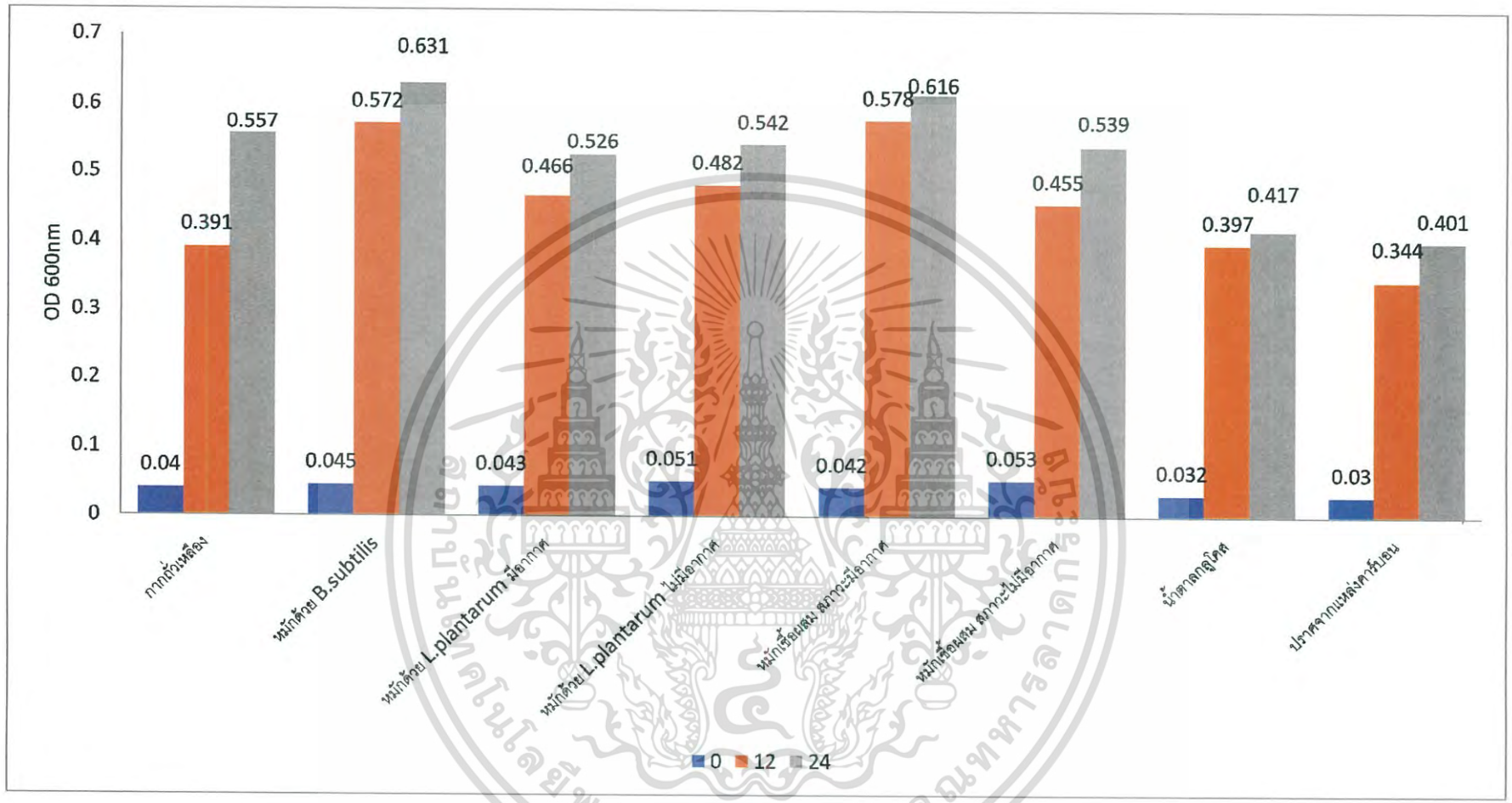
แหล่งคาร์บอน	เวลา (ชั่วโมง)	ค่า OD	pH	Log (CFU/ml)	
				L. plantarum	*E. coli*
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	0	$0.042^{a} \pm 0.0010$	$7.03^{d} \pm 0.0115$	$8.2631^{a} \pm 0.0136$	$8.1324^{ab} \pm 0.0645$
	12	$0.578^{d} \pm 0.0010$	$5.87^{bc} \pm 0.0115$	$9.2718^{e} \pm 0.0070$	$9.0838^{e} \pm 0.0137$
	24	$0.616^{e} \pm 0.0021$	$5.73^{b} \pm 0.0100$	$8.9620^{cd} \pm 0.0167$	$8.6385^{cd} \pm 0.0460$
	การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์			0.6989	0.5061
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	0	$0.053^{a} \pm 0.0010$	$6.93^{cd} \pm 0.0115$	$8.6002^{b} \pm 0.0491$	$8.1828^{ab} \pm 0.0611$
	12	$0.455^{c} \pm 0.0012$	$6.17^{c} \pm 0.0100$	$9.1127^{d} \pm 0.0135$	$8.7929^{d} \pm 0.0496$
	24	$0.539^{cd} \pm 0.0006$	$6.10^{c} \pm 0.0115$	$8.8107^{c} \pm 0.0538$	$8.3853^{bc} \pm 0.0924$
	การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์			0.2105	0.2025
น้ำตาลกลูโคส	0	$0.032^{a} \pm 0.0010$	$6.73^{cd} \pm 0.0058$	$8.1231^{a} \pm 0.0491$	$8.1338^{ab} \pm 0.0496$
	12	$0.397^{b} \pm 0.0006$	$5.91^{bc} \pm 0.0058$	$9.0642^{d} \pm 0.0173$	$8.7964^{d} \pm 0.0293$
	24	$0.417^{bc} \pm 0.0006$	$5.87^{bc} \pm 0.0100$	$8.8387^{c} \pm 0.0126$	$8.6444^{cd} \pm 0.0561$
	การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์			0.7157	0.5106
ปราศจากแหล่งคาร์บอน	0	$0.030^{a} \pm 0.0006$	$7.12^{d} \pm 0.0115$	$8.0402^{a} \pm 0.0396$	$8.1647^{ab} \pm 0.0462$
	12	$0.344^{b} \pm 0.0023$	$6.26^{c} \pm 0.0153$	$8.9679^{cd} \pm 0.0281$	$8.6552^{cd} \pm 0.0392$
	24	$0.401^{bc} \pm 0.0010$	$6.13^{c} \pm 0.0058$	$8.3785^{ab} \pm 0.0468$	$8.4552^{bc} \pm 0.0540$
	การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์			0.3383	0.2904

หมายเหตุ : $^{a-e}$ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

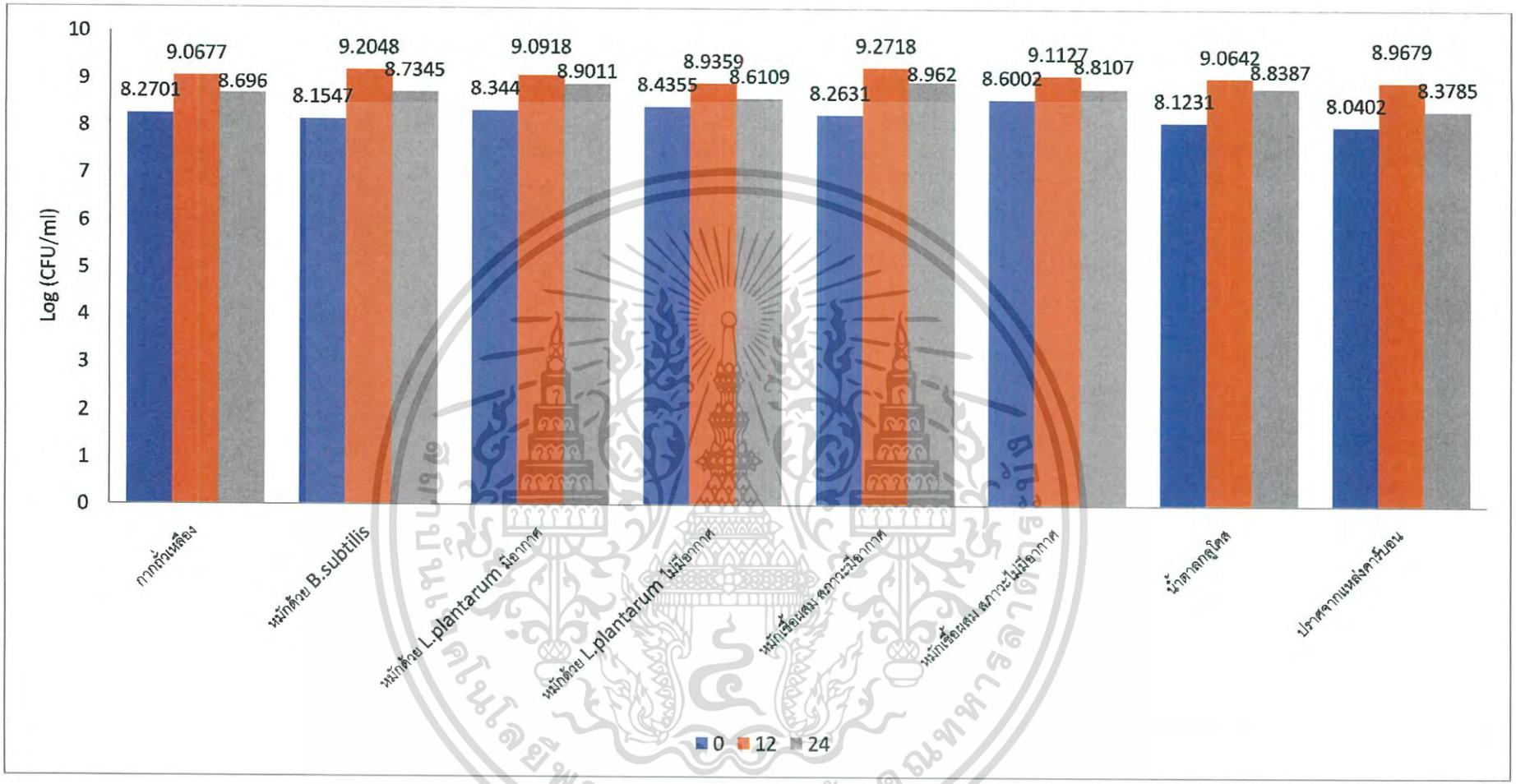
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



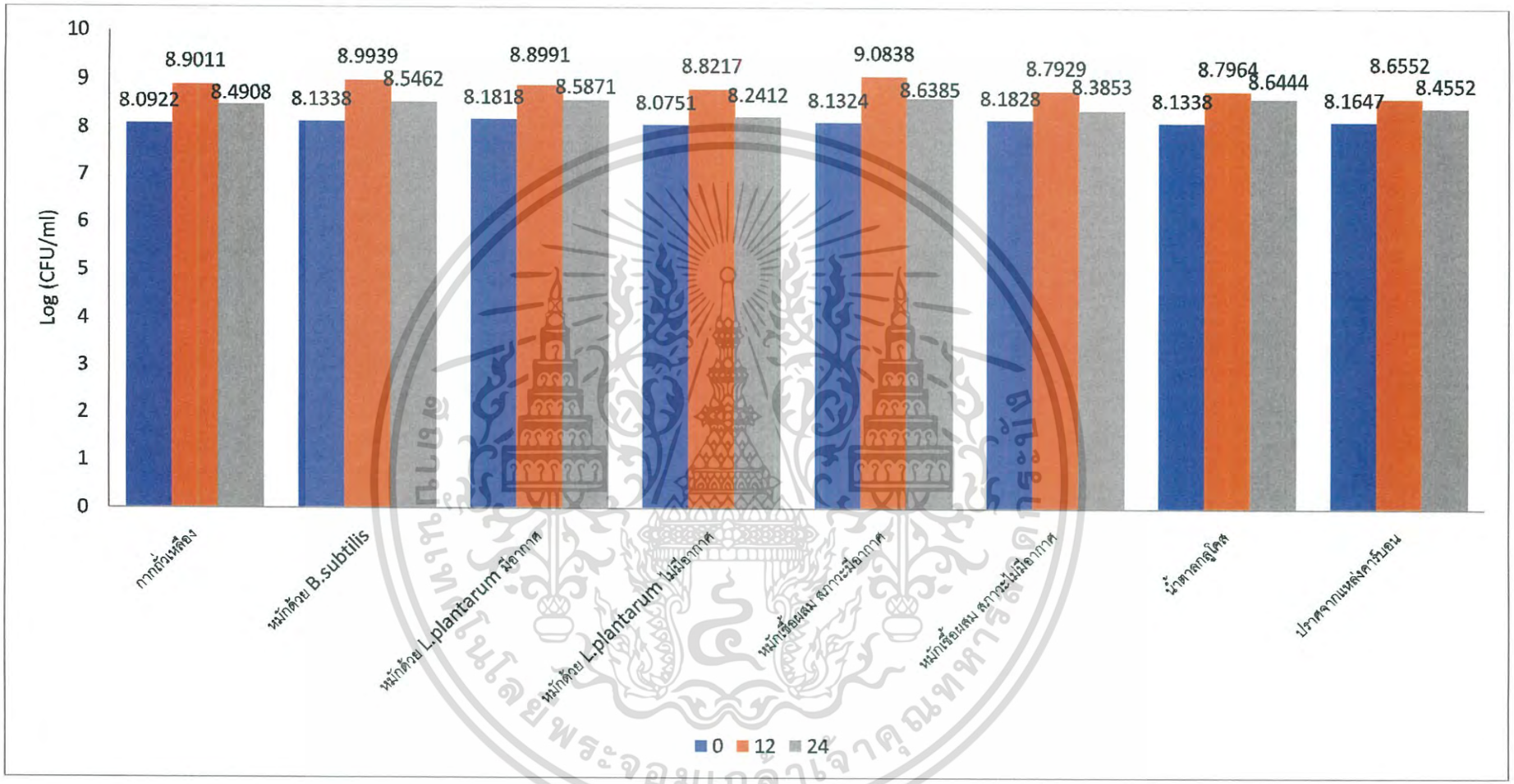
ภาพที่ 4.8 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และเวลาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน



ภาพที่ 4.9 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และเวลาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน



ภาพที่ 4.10 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ Log (CFU/ml) และเวลาของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน



ภาพที่ 4.11 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ Log (CFU/ml) และเวลาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากผลการทดลองหมักกากถั่วเหลืองด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* TISTR 001, *L. plantarum* TISTR 862 และ *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 พบว่าตัวอย่างกากถั่วเหลืองหมักมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจากตัวอย่างกากถั่วเหลือง และการศึกษาสารประกอบหลักของกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมัก พบว่าสารประกอบของตัวอย่างกากถั่วเหลืองหมักนั้นมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างกากถั่วเหลือง เนื่องมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ มีการใช้คาร์โบไฮเดรตในกากถั่วเหลืองที่มีความสำคัญต่อโครงสร้างของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลที่ให้พลังงานแก่องค์ประกอบของเซลล์ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญ เมื่อมีการใช้หรือย่อยองค์ประกอบของกากถั่วเหลือง จะได้น้ำตาลโมเลกุลที่เล็กลงหรือน้ำตาลรีดิวซ์หรือน้ำตาลอิสระ (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2553) เมื่อนำตัวอย่างกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมักมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาการเจริญร่วมกันของจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติก และจุลินทรีย์ก่อโรคพบว่าจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกสามารถเจริญได้ดีที่สุดเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 สภาวะมีอากาศ และสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ เนื่องจากเชื้อ *B. subtilis* ต้องการออกซิเจนเป็นจำนวนมากในการเจริญเติบโตทำให้ความเข้มข้นของออกซิเจนในระหว่างการหมักลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นผลดีต่อเชื้อ *L. plantarum* โดยเชื้อสามารถผลิตกรดแล็คติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค (Pathogen) และจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่สามารถทนกรดที่ผลิตออกมาจากเชื้อ *L. plantarum* ได้ (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2553)

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.1.1 ควรจัดเก็บตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่ได้จากโรงงานน้ำนมถั่วเหลืองที่อุณหภูมิติดลบหรือต่ำกว่าเพื่อป้องกันการเน่าเสียของกากถั่วเหลืองที่จะนำมาศึกษา

5.1.2 ควรจัดเก็บตัวอย่างกากถั่วเหลือง เมื่อหมักครบตามระยะเวลาตามที่กำหนดในอุณหภูมิติดลบหรือต่ำกว่า เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์และป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น

5.1.3 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการสกัด ยังมีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่ำจึงต้องทำการสกัดโดยวิธีระเหยสุญญากาศ (Evaporation) ให้มีความเข้มข้นมากขึ้นในปริมาณที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.4 การใช้เชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นจากการคำนวณจากสมการอัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์นั้น ควรใช้เชื้อในปริมาณที่คำนวณได้ เนื่องจากอาจทำให้เชื้อเริ่มต้นที่ได้มีปริมาณไม่เท่ากัน หรือใกล้เคียงกัน ทำให้ไม่สามารถนำปริมาณเชื้อมาเปรียบเทียบกันได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ขนิษฐา. 2559. ชนิดของคาร์โบไฮเดรต. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http:/www.tpa.or.th/writer/read_this_book_topic.php?bookID=140&pageid=3&read=true&count=true. 21 พ.ย. 2562.

ขนิษฐา. 2559. คาร์โบไฮเดรต. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http//www.tpa.or.th/writer/readthisbook_topic.php?bookID=140&pageid=2&read=true&count=true. 21 พ.ย. 2562.

จุฑาทิพย์ พุ่มเจริญ ปาริชาติ ศรีสวัสดิ์ และ สุนัดดา ดวงครุฑ. 2559. การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดเรตจากกากถั่วเหลืองหมักโดย บาซิลัส ซับทีลิส และ แอสเปอร์จิลลัส โอรีซี. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. 2546. เอกสารประกอบการสอนเคมีวิเคราะห์. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ คณะ. 2553. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0316/fermentation-81. 6 มิ.ย. 2562.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ คณะ. 2553. Escherichia coli / E. coli. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1125/escherichia-coli-e-coli. 23 พ.ย. 2562.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ คณะ. 2553. probiotic/โพรไบโอติก. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0780/probiotic-โพรไบโอติก. 23 พ.ย. 2562.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ คณะ. 2558. Bacillus subtilis. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/6203/bacillus-subtilis. 23 พ.ย. 2562.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ คณะ. 2553. Carbohydrate / คาร์โบไฮเดรต. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1097/carbohydrate. 6 มิ.ย. 2562.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ คณะ. 2553. ลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1543/generation-time. 21 พ.ย. 2562.

เนติยะ ยอดเณร. 2555. กากนมถั่วเหลือง (soy-milk residue). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.thailivestock.com/cattle_handling/กากนมถั่วเหลือง-soy-milk-residue. 21 พ.ย. 2562.

นิรนาม. 2560. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://sciencebiologywow.blogspot.com/2013/01/blog-post_31.html. 24 พ.ย. 2562.

ณัฐกานต์ บำรุง และ ภัคจิรา รัตนคนึงธรรม. 2559. การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตจากกากถั่วเหลืองหมักด้วยจุลินทรีย์แลคโตบาซิลัส แพลนทารัม.วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ดาวรุ่ง ศิลาอ่อน และ ฌานิกา จันทสระ. 2558. ผลของกากถั่วเหลืองหมักน้ำคั้นจากเปลือกสับปะรดในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของลูกสุกรหย่านม. แก่นเกษตร 43 ฉบับพิเศษ 1: (2558).

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี 2558. การหมัก (Fermentation). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://th.wikipedia.org/wiki/การหมัก_(ชีวเคมี). 21 พ.ย. 2562.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี 2558. อาหารสัตว์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://th.wikipedia.org/wiki/อาหารสัตว์. 20 พ.ย. 2562.

ศิริรัตน์ เฉลยสรรพ, สุพรรษา ก้งเซ่ง และ มณฑล เลิศคณาวนิชกุล. 2554. ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารและแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ Lactobacillus plantarum เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ ปีที่ 14 ฉบับที่ 3 ฉบับพิเศษ.

สารานุกรมไทย. 2556. อาหารสัตว์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก :http://guru.sanook.com/134/. 20 พ.ย. 2562.

อุไล ภู่ประสง ปรารถนา เกตุบท เกษรา เพิ่มสุข จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ ภัทรา ผาสอน กนก รัตนะกนกชัย และ รัตติยา แววนุกูล. 2558. การคัดเลือกและการแยกเชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่าเพื่อใช้ปรับปรุงคุณค่าโภชนาการกากถั่วเหลืองหมักในอาหารสัตว์. ว. วิทย์. กษ. 46(3)(พิเศษ): 273-276.

Adeyemo, S.M. and Onilude, A.A. 2013. Enzymatic Reduction of Anti-nutritional Factors in Fermenting Soybeans by Lactobacillus plantarum Isolates from Fermenting Cereals. NIFOJ Vol. 31 No. 2, pages 84 – 90, 2013.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

AOAC. 1995. Official methods of analysis of AOAC international. 16th ed. Texas: Association of Official Analytical Chemistry.

Chun-Hua Chi and Seong-Jun Cho. 2015. Improvement of bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with Bacillus amyloliquefaciens versus Lactobacillus spp. and Saccharomyces cerevisiae. LWT - Food Science and Technology 68 (2016) 619e625.

Herkelman, K. L., G. L. Cromwell, S. T. Stakly, T. W. Pfeiffer and D. A. Knabe. 1992. Apparent digestibility of amino acids in raw and heated conventional and low-trypsin-inhibitor soybeans for pigs. J. Anim. Sci. 70:818-826.

Holm H, Thorsen LI, Flatmark LI, Hanssen LE. 1992. Raw soybeans stimulate human pancreatic proteinase secretion. J Nutr 1992; 122: 1407-16.

Hong KJ, Lee CH, Kim SW. 2004. Aspergillus oryzae GB-107 fermentation improves nutritional quality of food soybeans and soybean meal. J Med Food 2004; 7: 430-6.

Joan Slonczewski และ คณะ. 2013. Lactobacillus plantalum. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus_plantarum_and_its_biological_implications. 23 พ.ย. 2562.

M. R. Smiricky-Tjardes และ คณะ. 2014. In vitro fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microflora. J ANIM SCI 2003, 81:2505-2514.

Pluske JR, Pethick DW, Hopwood DE, Hampson DJ. 2002. Nutritional influences on some major enteric bacterial disease of pigs. Nutr Res Rev 2002; 15: 333-71.

Yilmaz, M., Soran, H. & Beyatli, Y. 2006. Antimicrobial activities of some Bacillus spp. strains isolated from the soil. Microbiological Res., 161(2), 127-131.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 Luria-Bertani Broth (LB broth)

1.	Tryptone	10.0	กรัม
2.	Yeast extract	5.0	กรัม
3.	NaCl	5.0	กรัม
4.	Distilled water	1000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปปรับพีเอชให้ได้ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับอาหารแข็ง (LB Agar) จะมีการเตรียมผงวุ้น 20 กรัม (2.0 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเตรียมโดยผสมองค์ประกอบต่างๆในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ยกเว้นผงวุ้น นำไปต้มให้ความร้อนจนวุ้นหลอมละลาย เติม Tributyrin oil 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นขณะร้อนด้วยเครื่องปั่นความเร็วผสม ความเร็ว 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.2 Plate Count Agar (Standard Method)

1.	Tryptone	5.0	กรัม
2.	Yeast extract	2.5	กรัม
3.	Dextrose	1	กรัม
4.	Agar	15	กรัม
5.	Distilled water	1000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ปรับให้มีพีเอช 6.8 – 7.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3 Potato Dextrose agar (PDA)

1.	Potato	200	กรัม
2.	Dextrose	20	กรัม
3.	Agar	20	กรัม
4.	Distilled water	1000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยหั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็กๆขนาดเท่าลูกเต๋า โดยไม่ปอกเปลือก และในไปต้มในในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับให้มีพีเอช 3.5 ก่อน ต้มประมาณ 30 นาที จากนั้นกรองเอาส่วนที่เป็นเนื้อมันฝรั่งออก นำส่วนที่เป็นน้ำมาผสมกับ agar และ dextrose ปรับให้มีพีเอช 5.4 – 5.8 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.4 Nutrient Agar (NA)

1.	Beef extract	3	กรัม
2.	Peptone	5	กรัม
3.	Agar	15	กรัม
4.	Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.5 Nutrient Broth (NB)

1.	Beef extract	3	กรัม
2.	Peptone	5	กรัม
3.	Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 6.8 – 7.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.6 Basal Media

1.	KH_2PO_4	0.1	กรัม
2.	K_2HPO_4	0.3	กรัม
3.	Yeast extract	1.0	กรัม
4.	Peptone	5.0	กรัม
5.	$MgSo_4$	0.2	กรัม
6.	$(NH_4)_2SO_4$	2.5	กรัม
7.	Carbon source	10.0	กรัม
8.	Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

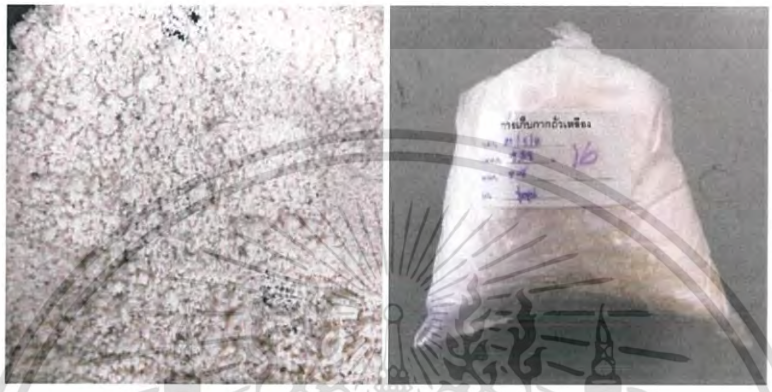
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วัตถุดิบและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

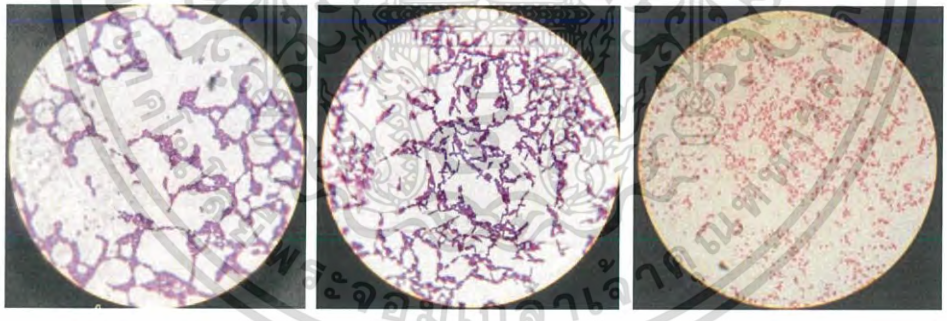
ข.1 วัตถุดิบ

1. กากถั่วเหลืองจากอุตสาหกรรมนมถั่วเหลือง



ภาพที่ ข.1 กากถั่วเหลืองจากอุตสาหกรรมนมถั่วเหลือง

2. เชื้อจุลินทรีย์ *L. plantarum* TISTR 862, *B. subtilis* TISTR 001 และ *E. coli* TISTR 073



ภาพที่ ข.2 ภาพเชื้อจุลินทรีย์ *L. plantarum* TISTR 862, *B. subtilis* TISTR 001 และ *E. coli* TISTR 073 จากกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ภาพที่ ข.3 เครื่องชั่งสารแบบละเอียด Sartorius รุ่น CPA3245

ภาพที่ ข.4 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) OHAUS starter 2100

ภาพที่ ข.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) Eppendorf รุ่น 5804

ภาพที่ ข.6 ตู้อบลมร้อน (Heating and Drying Ovens) Heraeus รุ่น T20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ข.7 เครื่องผสมสารละลาย
(Vortex mixer)

ภาพที่ ข.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
(Water bath)

ภาพที่ ข.9 ตู้ดูดควันสารเคมี
(Fume hood)

ภาพที่ ข.10 หม้อนึ่งความดันไอ
(Autoclave, Tomy ES-315)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ข.11 ตู้อบ (Hot air oven)

ภาพที่ ข.12 เครื่อง Biohazard Laminar Flow Thermo scientific

ภาพที่ ข.13 เครื่องตีบดผสมตัวอย่าง (Stomacher) Bag mixer

ภาพที่ ข.14 ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Shaking Incubator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ข.15 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

ภาพที่ ข.16 เครื่อง UV-VIS spectrophotometer

ภาพที่ ข.17 เตาเผา (Muffle Furnace)

ภาพที่ ข.18 อุปกรณ์ชุดวิเคราะห์โปรตีน (Kjeldahl apparatus)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ข.19 อุปกรณ์ชุดวิเคราะห์ไขมัน
(Soxhlet apparatus)

ภาพที่ ข.20 เครื่องกลั่นระเหยสาร สุญญากาศ
(Rotary Evaporator)

ภาพที่ ข.21 เครื่องวิเคราะห์ใยอาหาร
(Fiber Extraction apparatus)

ภาพที่ ข.22 เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ
(Water Activity) Aqualab รุ่น 3TE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ข.23 เครื่องอบแห้งแบบถาด (Tray Dryer)

ภาพที่ ข.24 ตู้แช่แข็ง (Freezer)

ภาพที่ ข.25 ไมโครเวฟ (Microwave)

ภาพที่ ข.26 กล้องจุลทรรศน์ (Light Microscope)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
วิธีการวิเคราะห์

ค.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟิวริก

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 0.01 กรัม ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร สารละลายกลูโคสที่ได้จะมีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

4. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร โดยปล่อยให้กรดซัลฟิวริกไหลลงบนผิวของสารละลายในหลอดทดลองโดยตรงเพื่อให้มีการผสมที่ดีและรวดเร็วอย่าปล่อยให้กรดซัลฟิวริกไหลลงตรงข้างหลอดและห้ามเขย่าหลอด

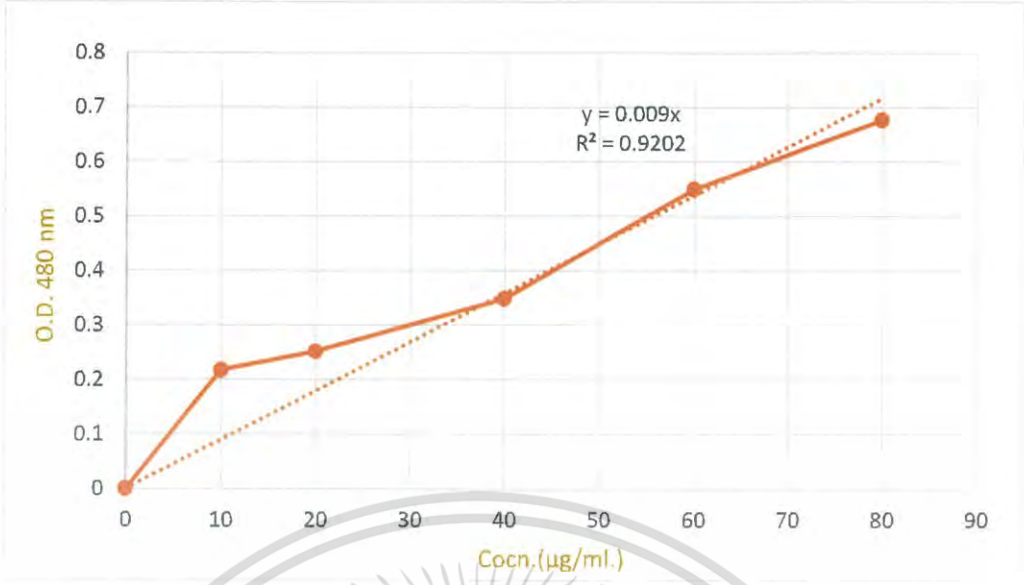
5. ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ 10 นาทีและเขย่าให้เข้ากันนำไปวัดดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 480 นาโนเมตร

6. วิธีการวิเคราะห์ทำเช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐานที่กล่าวไปและสำหรับตัวควบให้เตรียมโดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

ตารางที่ ค.1 ตารางค่ามาตรฐานของฟีนอล-ซัลฟิวริก

ความเข้มข้น	ค่าการดูดกลืนแสงกลูโคส 480 นาโนเมตร			
(µg/ml)	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	เฉลี่ย
0	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.224	0.197	0.233	0.218
20	0.266	0.249	0.241	0.252
40	0.339	0..358	0.350	0.349
60	0.549	0.542	0.559	0.550
80	0.670	0.682	0.680	0.677

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพ ค.1 กราฟมาตรฐานของฟีนอล - ซัลฟิวริก

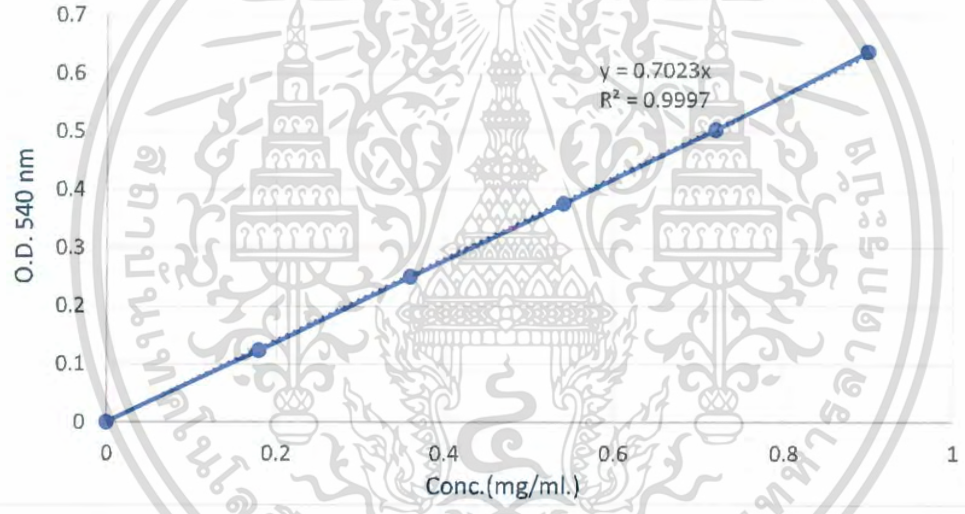
ค.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (กรด 3, 5- ไดไนโตรซาลิไซลิก)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัมในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร สารละลายกลูโคสที่ได้จะมีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3. เติม กรด 3, 5- ไดไนโตรซาลิไซลิกหลอดละ 1.0 มิลลิลิตร
4. แช่หลอดทดลองในน้ำเดือดนาน 5 นาที และนำมาแช่ในน้ำเย็นทันที
5. เมื่อเย็นถึงอุณหภูมิห้องแล้วให้เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เท่ากัน
6. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
7. วิธีการวิเคราะห์ทำเช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐานที่ได้กล่าวไปและสำหรับตัวควบคุมให้เตรียมโดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 ตารางค่ามาตรฐานของ DNS

ความเข้มข้น	ค่าการดูดกลืนแสงกลูโคส 540 นาโนเมตร			
(mg/ml)	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	เฉลี่ย
0	0.000	0.000	0.000	0.000
0.2	0.120	0.123	0.126	0.123
0.4	0.242	0.248	0.260	0.250
0.6	0.378	0.377	0.375	0.376
0.8	0.510	0.493	0.508	0.503
1.0	0.647	0.639	0.628	0.638



ภาพ ค.2 กราฟมาตรฐานของ DNS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
วิธีการเตรียมสารเคมี

ง.1 Dinitrosalicylic reagent (DNS reagent)

1. ละลาย 3, 5- dinitrosalicylic 1 กรัม ใน 2 นอร์มอล NaOH 20 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม potassium tartrate ลงไป 30 กรัม คนให้ละลาย
3. ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ง.2 Stock solution สำหรับวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด

1. เตรียมสารละลายกลูโคส 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายกลูโคส 0.01 กรัม ในน้ำกลั่น
2. ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ง.3 สารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

1. เตรียมสารละลายกลูโคส 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายกลูโคส 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น
2. ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ง.4 สารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์

1. ชั่งฟีนอล 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์
2. เติมน้ำกลั่น 95 กรัม ใช้แท่งแก้วคนให้ละลาย

ง.5 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 N

1. ปิเปต 37% กรดไฮโดรคลอริก 8.26 มิลลิลิตรลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ง.6 สารละลายกรดบอริก 2 เปอร์เซ็นต์

1. เตรียมสารละลายกรดบอริก 2 กรัม ในน้ำกลั่น
2. ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง.7 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.255 N

1. ปิเปตกรดซัลฟิวริก 98.1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 6.93 มิลลิลิตร หรือปิเปตกรดซัลฟิวริก 96 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 7.10 มิลลิตร
2. ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ง.8 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.313 N

1. ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น
2. ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ง.9 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล

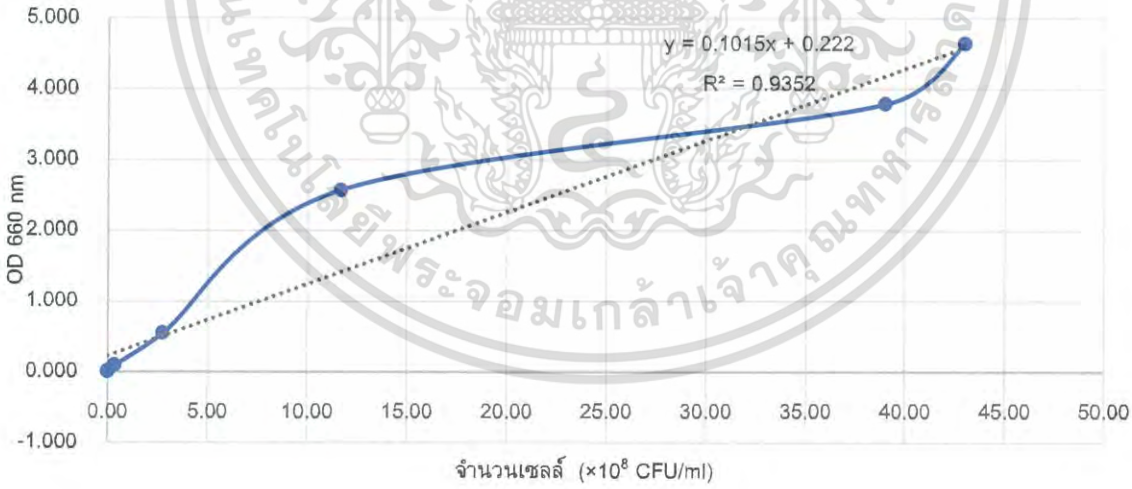
1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ทำให้ละลายในน้ำกลั่น
2. ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ
ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

ตารางที่ จ.1 ข้อมูลอัตราการเจริญของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862

เวลา (ชม.)	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ ($x10^8$ CFU/ml)	เฉลี่ย ($x10^8$ CFU/ml)	Log (CFU/ml)	ค่าเฉลี่ย OD	S.D.
0	0.019	0.02	6.298	-0.005	0.002
3	0.018	0.02	6.263	0.004	0.004
6	0.039	0.04	6.591	0.008	0.002
9	0.350	0.35	7.544	0.086	0.004
12	2.765	2.77	8.441	0.538	0.045
15	11.70	12.0	9.068	2.563	0.004
18	39.00	39.0	9.591	3.780	0.008
21	43.00	43.0	9.633	4.633	0.006



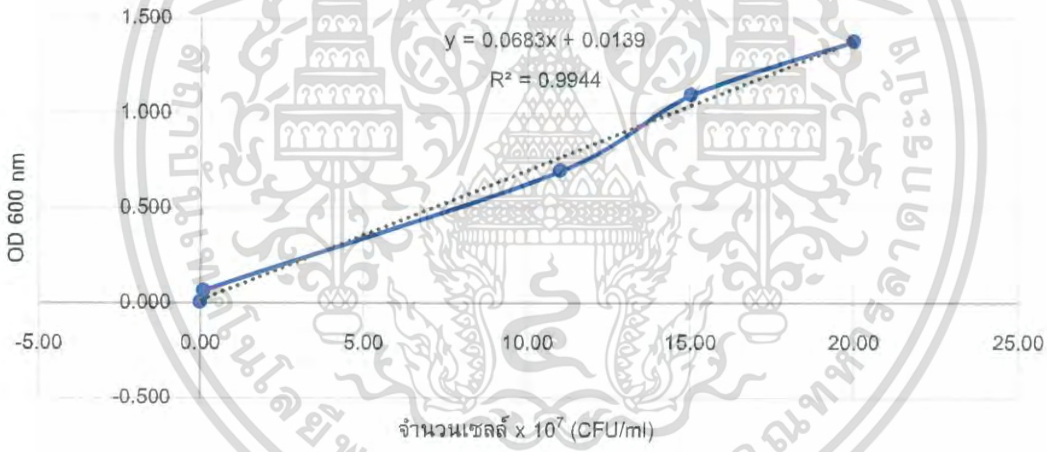
ภาพที่ จ.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และจำนวนเซลล์ (CFU/ml) ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862

ที่มา: ณัฐกานต์ และ ภัคจิรา (2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.2 ข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001

เวลา (ชม.)	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ ($x10^7$ CFU/ml)	เฉลี่ย ($x10^7$ CFU/ml)	Log (CFU/ml)	ค่าเฉลี่ย OD	S.D.
0	0.0001	0.00	4.102	0.002	0.001
3	0.0009	0.00	4.954	0.002	0.001
6	0.10	0.10	5.796	0.063	0.006
9	11.4	11.0	8.057	0.694	0.005
12	15.1	15.0	8.180	1.094	0.067
15	20.4	20.0	8.309	1.377	0.011
18	56.5	57.0	8.752	1.538	0.031
21	26.0	26.0	8.415	1.647	0.016



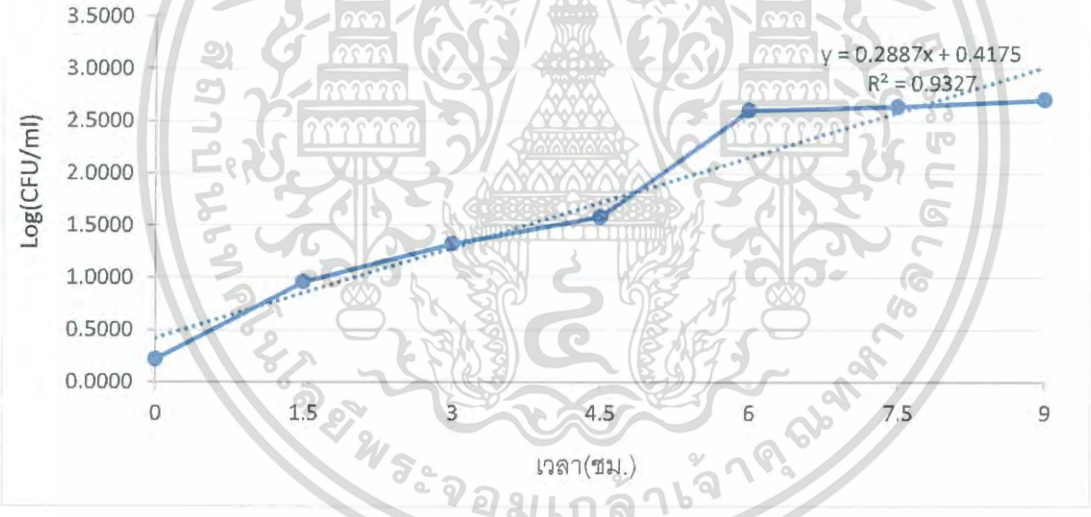
ภาพที่ จ.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และจำนวนเซลล์ (CFU/ml) ของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001

ที่มา: จุฑาทิพย์ และ คณะ (2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.3 ข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* TISTR 073

เวลา (ชม.)	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (colony)			จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ ($\times 10^6$ CFU/ml)	เฉลี่ย ($\times 10^6$ CFU/ml)	Log (CFU/ml)	ค่าเฉลี่ย OD	S.D.
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3					
0.0	225	227	220	0.022	0.02	4.35	0.003	0.001
1.5	179	182	182	0.180	0.18	5.26	0.012	0.002
3.0	99	144	78	10.70	11.0	7.03	0.153	0.005
4.5	149	177	185	17.00	17.0	7.23	0.469	0.020
6.0	102	117	98	106.0	106.0	8.03	0.762	0.005
7.5	77	124	138	113.0	113.0	8.05	0.955	0.021
9.0	84	149	149	127.0	127.0	8.10	0.963	0.024



ภาพที่ จ.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และจำนวนเซลล์ (CFU/ml) ของเชื้อ *E. coli* TISTR 073

ที่มา: ณัฏฐณิชา และภูริชญา (2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากการสกัดกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมัก
อัตราส่วนที่ใช้คือ 1:2 อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที (กากถั่วเหลือง 2000 กรัม : น้ำกลั่น 4000 มิลลิลิตร)

ตัวอย่าง	อุณหภูมิ (°C)	เจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสง 480 นาโนเมตร				ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (µg/ml)			
			ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย
กากถั่วเหลือง	60	2000	0.780	0.675	0.773	0.743	173333.33	150000.00	171777.78	165037.04 ± 13045.66
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis*	60	2000	0.234	0.240	0.232	0.235	52000.00	53333.33	51555.56	52296.30 ± 925.18
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum*	60	2000	0.189	0.198	0.186	0.191	42000.00	44000.00	41333.33	42444.44 ± 1387.78

ตัวอย่าง	อุณหภูมิ (°C)	เจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสง 480 นาโนเมตร				ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (µg/ml)			
			ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	60	2000	0.316	0.281	0.292	0.296	70222.22	62444.44	64888.89	65851.85 ± 3977.30
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	60	2000	0.213	0.221	0.219	0.218	47333.33	49111.11	48666.67	48370.37 ± 925.20
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	60	2000	0.212	0.204	0.208	0.208	47111.11	45333.33	46222.22	46222.22 ± 888.89

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ จ.5 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากการสกัดกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมัก
อัตราส่วนที่ใช้คือ 1:2 อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที (กากถั่วเหลือง 2000 กรัม : น้ำกลั่น 4000 มิลลิลิตร)

ตัวอย่าง	ปริมาณที่สกัดออกมาได้ (mL.)			ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (g/ml)				ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (g/g)			
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	เฉลี่ย	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย
กากถั่วเหลือง	2550	2450	2500	0.173	0.150	0.172	0.165	0.0095	0.0083	0.0094	0.0091 ± 0.0007
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001	2720	2980	2850	0.052	0.053	0.052	0.052	0.0074	0.0076	0.0074	0.0075 ± 0.0001
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* TISTR 862	2340	2460	2400	0.042	0.044	0.041	0.042	0.0050	0.0053	0.0049	0.0050 ± 0.0002

ตัวอย่าง	ปริมาณที่สกัดออกมาได้ (ml.)			ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (g/ml)				ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (g/g)			
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	เฉลี่ย	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะมีอากาศน้อย	2250	1990	2120	0.070	0.062	0.065	0.066	0.0046	0.0040	0.0042	0.0043 ± 0.0003
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	3100	2900	3000	0.047	0.049	0.049	0.048	0.0071	0.0074	0.0074	0.0072 ± 0.0002
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	2480	2180	2330	0.047	0.045	0.046	0.046	0.0028	0.0027	0.0028	0.0028 ± 0.0001

ตารางที่ จ.6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการสกัดกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมัก

อัตราส่วนที่ใช้คือ 1:2 อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที (กากถั่วเหลือง 2000 กรัม : น้ำกลั่น 4000 มิลลิลิตร)

ตัวอย่าง	อุณหภูมิ (°C)	เจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร				ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)			
			ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย
กากถั่วเหลือง	60	100	0.260	0.214	0.223	0.232	37.02	30.47	31.75	33.08 ± 3.4718
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis*	60	100	0.118	0.224	0.112	0.151	16.80	31.89	15.95	21.55 ± 8.9677
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum*	60	100	0.111	0.224	0.112	0.151	15.81	16.23	16.66	16.23 ± 0.4250

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตัวอย่าง	อุณหภูมิ (°C)	เจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร				ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)			
			ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	60	100	0.105	0.103	0.101	0.103	29.90	29.33	28.76	29.33 ± 0.5700
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	60	100	0.137	0.133	0.128	0.133	19.50	18.94	18.23	18.89 ± 0.6365
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	60	100	0.127	0.126	0.123	0.125	18.08	17.94	17.51	17.85 ± 0.2982

ตารางที่ จ.6 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการสกัดกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมัก

อัตราส่วนที่ใช้คือ 1:2 อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที (กากถั่วเหลือง 2000 กรัม : น้ำกลั่น 4000 มิลลิลิตร)

ตัวอย่าง	อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณที่สกัดออกมาได้ (ml.)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/ml)				ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/g)			
		ซ้ำ1	ซ้ำ2	เฉลี่ย	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย
กากถั่วเหลือง	60	2550	2450	2500	0.037	0.030	0.032	0.033	0.0020	0.0017	0.0018	0.0018 ± 0.0002
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001	60	2720	2980	2850	0.017	0.032	0.016	0.022	0.0024	0.0046	0.0023	0.0031 ± 0.0013
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* TISTR 862	60	2340	2460	2400	0.016	0.016	0.017	0.016	0.0019	0.0019	0.0020	0.0020 ± 0.0001

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตัวอย่าง	อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณที่สกัดออกมาได้ (mL.)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/ml)				ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/g)			
		ซ้ำ1	ซ้ำ2	เฉลี่ย	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	60	2250	1990	2120	0.030	0.029	0.029	0.029	0.0020	0.0019	0.0019	0.0019 ± 0.0001
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	60	3100	2900	3000	0.019	0.019	0.018	0.019	0.0029	0.0029	0.0027	0.0028 ± 0.0001
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	60	2480	2180	2330	0.018	0.017	0.018	0.018	0.0011	0.0010	0.0011	0.0011 ± 0.0001

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ จ.7 ปริมาณน้ำตาลที่สกัดแล้วถูกทำให้เข้มข้น

นำน้ำตาลที่สกัดได้มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสาร สุญญากาศ (Rotary Evaporator)

ตัวอย่าง	ปริมาณที่สกัดออกมาได้ (mL.)			ปริมาณที่ถูกทำให้เข้มข้น (mL.)
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	เฉลี่ย	
กากถั่วเหลือง	2550	2450	2500	110
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001	2720	2980	2850	285
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* TISTR 862	2340	2460	2400	240

ตัวอย่าง	ปริมาณที่สกัดออกมาได้ (ml.)			ปริมาณที่ถูกทำให้เข้มข้น (ml.)
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	เฉลี่ย	
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	2250	1990	2120	130
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	3100	2900	3000	300
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	2480	2180	2330	120

ตารางที่ จ.8 การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น เถ้า ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต จากกากถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองหมัก

1. ความชื้น

ตัวอย่าง	น้ำหนักcan + ฝา (g)	น้ำหนักกากถั่วเหลือง (g) (ก่อนอบ)	น้ำหนักcan+ฝา+กากถั่วเหลือง (g)		% ความชื้น	% ความชื้นเฉลี่ย	S.D.
			(ก่อนอบ)	(หลังอบ)			
กากถั่วเหลือง	17.4816	10.0761	27.5577	26.3519	11.9669	14.09	3.2436
	17.5120	10.1140	27.6260	25.8232	17.8248		
	17.1108	10.0921	27.2029	25.9432	12.4820		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis*	17.5165	10.2145	27.7310	24.6757	29.9114	29.97	2.5622
	17.6840	10.1752	27.8592	24.5464	32.5576		
	17.5628	10.2347	27.7975	24.9897	27.4341		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	17.8480	10.1232	27.9712	24.7122	32.1934	26.95	4.5754
	17.4128	10.1324	27.5452	25.1352	23.7851		
	17.2253	10.2412	27.4665	24.9203	24.8623		

ตัวอย่าง	น้ำหนักcan + ฝา (g)	น้ำหนักกากถั่วเหลือง (g) (ก่อนอบ)	น้ำหนักcan+ฝา+กากถั่วเหลือง (g)		% ความชื้น	% ความชื้นเฉลี่ย	S.D.
			(ก่อนอบ)	(หลังอบ)			
กากถั่วเหลืองหมักด้วย	17.4816	10.3453	27.8269	26.1829	15.8913		
L. plantarum	17.5120	10.6556	28.1676	26.2118	18.3547	16.75	1.3881
สภาวะไม่มีอากาศ	17.1108	10.5606	27.6714	25.9802	16.0142		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย	17.5165	10.5723	28.0888	25.2163	27.1701		
B. subtilis ร่วมกับ	17.6840	10.2033	27.8873	24.9081	29.1984	28.60	1.2391
L. plantarum สภาวะมีอากาศ	17.5628	10.4534	28.0162	24.9411	29.4172		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย	17.8480	10.3245	28.1725	24.4352	36.1984		
B. subtilis ร่วมกับ	17.4128	10.4506	27.8634	23.8342	38.5547	30.82	11.4155
L. plantarum							
สภาวะไม่มีอากาศ	17.2253	10.5675	27.7928	25.9213	17.7100		

2. เถ้า

ตัวอย่าง	น้ำหนัก crucible (g)	น้ำหนักกากถั่วเหลือง (g) (ก่อนอบ)	น้ำหนัก crucible + กากถั่วเหลือง (g)		% เถ้า	% เถ้าเฉลี่ย	S.D.
			(ก่อนอบ)	(หลังอบ)			
กากถั่วเหลือง	35.3966	3.0457	38.4423	35.4293	1.0736		
	32.4602	3.1845	35.6447	32.5911	4.1105	2.87	1.5917
	36.4863	3.2436	39.7299	36.5972	3.4190		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis*	30.2389	3.0531	33.2920	30.3562	3.8420		
	35.3592	3.0572	38.4164	35.4628	3.3887	3.59	0.2321
	36.5931	3.1485	39.7416	36.7042	3.5287		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	35.1045	3.1475	38.252	35.2247	3.8189		
	36.3911	3.0234	39.4145	36.4102	0.6317	2.60	1.7209
	34.2594	3.0863	37.3457	34.3628	3.3503		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	35.8240	3.1642	38.9882	35.9304	3.3626		
	30.2584	3.0715	33.3299	30.3813	4.0013	2.81	1.5484
	32.4917	3.0538	35.5455	32.5240	1.0577		

ตัวอย่าง	น้ำหนัก crucible (g)	น้ำหนักกากถั่วเหลือง (g) (ก่อนอบ)	น้ำหนัก crucible + กากถั่วเหลือง (g)		% เถ้า	% เถ้าเฉลี่ย	S.D.
			(ก่อนอบ)	(หลังอบ)			
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	36.4906	3.1963	39.6869	36.5732	2.5842	2.68	0.6298
	35.3248	3.2158	38.5406	35.3927	2.1114		
	34.5923	3.0516	37.6439	34.6948	3.3589		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	30.7419	3.0104	33.7523	30.8482	3.5311	2.99	0.5069
	32.5802	3.2286	35.8088	32.6739	2.9022		
	35.3459	3.2160	38.5619	35.4272	2.5280		

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3. ไขมัน

ตัวอย่าง	น้ำหนักกากถั่วเหลือง (g) (ก่อนอบ)	น้ำหนักบีกเกอร์ + ลูกแก้ว (g) (ก่อนอบ)	น้ำหนักบีกเกอร์ + ลูกแก้ว + ไขมัน (g) (หลังอบ)	% ไขมัน	% ไขมันเฉลี่ย	S.D.
กากถั่วเหลือง	3.0144	143.0565	143.2495	6.4026	6.94	0.6913
	3.0427	145.2358	145.4395	6.6947		
	3.0263	144.2485	144.4821	7.7190		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis*	3.0381	142.3538	142.5932	7.8799	7.53	0.4669
	3.0341	145.3482	145.5821	7.7090		
	3.0317	143.4920	143.7042	6.9994		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	3.0138	140.3429	140.5731	7.6382	7.11	0.6971
	3.0521	142.3481	142.5732	7.3752		
	3.0138	141.4924	141.6829	6.3209		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	3.0813	139.8342	140.0348	6.5102	7.01	0.4990
	3.0137	142.4823	142.6932	6.9980		
	3.0247	144.8221	145.0492	7.5082		

ตัวอย่าง	น้ำหนักกากถั่วเหลือง (g) (ก่อนอบ)	น้ำหนักบีกเกอร์ + ลูกแก้ว (g) (ก่อนอบ)	น้ำหนักบีกเกอร์ + ลูกแก้ว + ไขมัน (g) (หลังอบ)	% ไขมัน	% ไขมันเฉลี่ย	S.D.
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	3.0137	145.2491	145.4853	7.8375	7.85	0.0890
	3.0189	140.3489	140.5832	7.7611		
	3.0245	142.3428	142.5829	7.9385		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	3.0256	141.2449	141.4832	7.8761	6.29	1.4234
	3.0461	145.3593	145.5381	5.8698		
	3.0173	143.3492	143.5038	5.1238		

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

4. โปรตีน

ตัวอย่าง	น้ำหนักกากถั่วเหลือง (g)	ไทเทรต HCl 0.1N (ml)	% โปรตีน	% โปรตีนเฉลี่ย	S.D.
กากถั่วเหลือง	0.5324	1.50	2.4653	2.42	0.1395
	0.5546	1.60	2.5243		
	0.5811	1.50	2.2586		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis*	0.5731	1.08	1.6489	1.70	0.1062
	0.5811	1.08	1.6262		
	0.5239	1.09	1.8205		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	0.5329	1.09	1.7897	1.73	0.0727
	0.5378	1.08	1.7572		
	0.5831	1.10	1.6507		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	0.5174	1.09	1.8434	1.79	0.1036
	0.5721	1.09	1.6671		
	0.5204	1.10	1.8495		

ตัวอย่าง	น้ำหนักกากถั่วเหลือง (g)	ไทเทรต HCl 0.1N (ml)	% โปรตีน	% โปรตีนเฉลี่ย	S.D.
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	0.5634	1.09	1.6928	1.74	0.0612
	0.5219	1.08	1.8107		
	0.5534	1.09	1.7234		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	0.5245	1.10	1.8351	1.75	0.0849
	0.5506	1.10	1.7481		
	0.5675	1.08	1.6652		

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

5. ใยอาหาร

ตัวอย่าง	น้ำหนัก crucible แก้ว (g) (ก่อนอบ)	น้ำหนักกากถั่วเหลือง (g) (ก่อนอบ)	น้ำหนัก crucible แก้ว+กากถั่วเหลือง (g) (ก่อนอบ)	(หลังอบ)	(หลังเผา)	% ใยอาหาร	% ใยอาหารเฉลี่ย	S.D.
กากถั่วเหลือง	30.4218	3.1374	33.5592	32.5874	32.1375	14.3399		
	30.4181	3.2391	33.6572	32.4867	32.0375	13.8680	13.32	1.3829
	29.8231	3.0348	32.8579	32.0357	31.6793	11.7438		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis*	30.3497	3.1394	33.4891	32.8234	32.4621	11.5086		
	29.8135	3.0823	32.8958	32.1383	31.7345	13.1006	11.94	1.0196
	30.2719	3.1479	33.4198	32.7231	32.3705	11.2011		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	30.5318	3.2345	33.7663	33.0246	32.6032	13.0283		
	30.7139	3.0267	33.7406	33.0138	32.6282	12.7399	13.20	0.5735
	30.8411	3.1974	34.0385	33.3469	32.9042	13.8456		

ตัวอย่าง	น้ำหนัก crucibleแก้ว (g) (ก่อนอบ)	น้ำหนักกากถั่วเหลือง (g) (ก่อนอบ)	น้ำหนัก crucible แก้ว+กากถั่วเหลือง (g) (ก่อนอบ)	(หลังอบ)	(หลังเผา)	% ใยอาหาร	% ใยอาหารเฉลี่ย	S.D.
กากถั่วเหลืองหมักด้วย	29.8217	3.2649	33.0866	32.1380	31.7238	12.6865		
L. plantarum	29.9338	3.0535	32.9873	32.1974	31.7345	15.1597	13.23	1.7180
สภาวะไม่มีอากาศ	30.2848	3.2562	33.5410	32.5359	32.1498	11.8574		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย	30.8312	3.1322	33.9634	33.0349	32.6802	11.3243		
B. subtilis ร่วมกับ	30.8391	3.2459	34.0850	33.2793	32.8474	13.3060	12.18	1.0183
L. plantarum สภาวะมีอากาศ	30.8721	3.0348	33.9069	32.9346	32.5732	11.9085		
กากถั่วเหลืองหมักด้วย	29.7459	3.1652	32.9111	31.9356	31.5221	13.0639		
B. subtilis ร่วมกับ	30.4215	3.2357	33.6572	32.7304	32.3589	11.4813	12.31	0.7943
L. plantarum								
สภาวะไม่มีอากาศ	30.5113	3.2021	33.7134	32.8249	32.4281	12.3919		

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

6. คาร์โบไฮเดรต

ตัวอย่าง	% ความชื้น	% เถ้า	% ไขมัน	% โปรตีน	% ใยอาหาร	% คาร์โบไฮเดรต
กากถั่วเหลือง	14.09 ± 3.2436	2.87 ± 1.5917	6.94 ± 0.6913	2.42 ± 0.1395	13.32 ± 1.3829	60.36 ± 4.7193
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis*	29.97 ± 2.5622	3.59 ± 0.2321	7.53 ± 0.4669	1.70 ± 0.1062	11.94 ± 1.0196	45.27 ± 3.6997
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	26.95 ± 4.5754	2.60 ± 1.7209	7.11 ± 0.6971	1.73 ± 0.0727	13.20 ± 0.5735	48.41 ± 6.2389
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	16.75 ± 1.3881	2.81 ± 1.5484	7.01 ± 0.4990	1.79 ± 0.1036	13.23 ± 1.7180	58.41 ± 4.1027

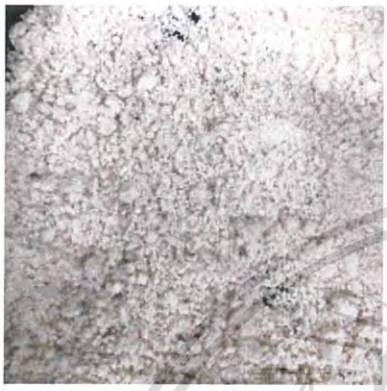
ตัวอย่าง	% ความชื้น	% เถ้า	% ไขมัน	% โปรตีน	% ใยอาหาร	% คาร์โบไฮเดรต
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะมีอากาศ	28.60 ± 1.2391	2.68 ± 0.6298	7.85 ± 0.0890	1.74 ± 0.0612	12.18 ± 1.0183	46.95 ± 2.1135
กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* ร่วมกับ *L. plantarum* สภาวะไม่มีอากาศ	30.82 ± 11.4155	2.99 ± 0.5069	6.29 ± 1.4234	1.75 ± 0.0849	12.31 ± 0.7943	45.84 ± 12.8032

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ภาคผนวก ฉ

รูปภาพประกอบ

ฉ.1 ลักษณะกากถั่วเหลือง



ภาพที่ ฉ.1 กากถั่วเหลืองสด

ภาพที่ ฉ.2 กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001

ภาพที่ ฉ.3 กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* TISTR 862 สภาวะมีอากาศ

ภาพที่ ฉ.4 กากถั่วเหลืองหมักด้วย *L. plantarum* TISTR 862 สภาวะไม่มีอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ฉ.5 กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 สภาวะมีอากาศ

ภาพที่ ฉ.6 กากถั่วเหลืองหมักด้วย *B. subtilis* TISTR 001 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 862 สภาวะไม่มีอากาศ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช
วิธีการคำนวณ

ช.1 การคำนวณปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่นำไปใช้ในการหมัก

1. การคำนวณปริมาณเชื้อที่ใช้ในการหมัก โดยเชื้อ *L. plantarum* TISTR 862 โดยใช้สมการ y = 0.1015x + 0.222 จาก **ภาพที่ จ.1**

ในปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ค่า OD ของเชื้อ *L. plantarum* เท่ากับ 2.023

จะได้ ค่า X = 1.77×10^9 CFU/ml

ปริมาณเชื้อที่นำไปใช้ เท่ากับ $\frac{1 \times 2.4 \times 10^9}{1.77 \times 10^9} = 1.356$ ml.

ดังนั้น ปริมาณเชื้อที่นำไปใช้ คือ 1.356 มิลลิลิตร

2. การคำนวณปริมาณเชื้อที่ใช้ในการหมัก โดยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 001 โดยใช้สมการ y = 0.00683x + 0.0139 จาก **ภาพที่ จ.2**

ในปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ค่า OD เชื้อ *B.subtilis* เท่ากับ 0.286

จะได้ ค่า X = 3.98×10^8 CFU/ml

ปริมาณเชื้อที่นำไปใช้ เท่ากับ $\frac{1 \times 7 \times 10^8}{3.98 \times 10^8} = 1.758$ ml.

ดังนั้น ปริมาณเชื้อที่นำไปใช้ คือ 1.758 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช.2 ตัวอย่างการคำนวณปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการหมัก

1. การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก

โดยใช้สมการ y = 0.009x จาก **ภาพที่ ค.1**

ตัวอย่างได้แก่ กากถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการหมัก โดยค่า OD. ของกากถั่วเหลืองเท่ากับ 0.780

จะได้ค่า x = 86.67 มีการเจือจาง 2,000 เท่า จะได้ 86.67 x 2,000 = 173,333.33 µg/ml.

เปลี่ยนเป็น g/ml. จะได้ $\frac{173,333.33}{1,000,000}$ = 0.1733 g/ml.

ถ้ากากถั่วเหลืองสกัดที่ถูกทำให้เข้มข้นปริมาตร 1 ml. มีน้ำตาลทั้งหมด = 0.1733 g/ml.

แล้วกากถั่วเหลืองสกัดที่ถูกทำให้เข้มข้นปริมาตร 110 ml. จะมีน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ

110 x 0.1733 = 19.067 g/ml.

- ดังนั้นใน 2,000 กรัมของกากถั่วเหลืองเปียก จะมีน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 19.067 กรัมต่อมิลลิลิตร

ถ้า 10 กรัมของกากถั่วเหลืองเปียก = 8.6713 กรัมของกากถั่วเหลืองแห้ง

แล้ว 2,000 กรัมของกากถั่วเหลืองเปียก มีกรัมของกากถั่วเหลืองแห้ง $\frac{(2,000 \times 8.6713)}{10}$ = 1,734.26 g/g

ถ้า 2,000 กรัมของกากถั่วเหลืองเปียก มีน้ำตาลทั้งหมด = 19.067 g/ml.

แล้ว 1,734.26 กรัมของกากถั่วเหลืองแห้ง จะมีน้ำตาลทั้งหมด $\frac{(1,734.26 \times 19.067)}{2,000}$ = 16.533 g/g

ถ้า 1,734.26 กรัมของกากถั่วเหลืองแห้ง มีน้ำตาลทั้งหมด = 16.533 g/g

แล้ว 1 กรัมของกากถั่วเหลืองแห้ง จะมีน้ำตาลทั้งหมด $\frac{(1 \times 16.533)}{1,734.26}$ = 0.0095 g/g

- ดังนั้น ในตัวอย่าง กากถั่วเหลือง 1 กรัม จะมีน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 0.0095 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช.2 (ต่อ) ตัวอย่างการคำนวณปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการหมัก

2. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีกรด 3, 5 - ไดไนโตรซาลิไซลิก

โดยใช้สมการ y = 0.7023x จาก **ภาพที่ ค.2**

ตัวอย่างได้แก่ กากถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการหมัก โดยค่า OD. ของกากถั่วเหลืองเท่ากับ 0.260

จะได้ค่า x = 0.3702 มีการเจือจาง 100 เท่า จะได้ 0.3702 x 100 = 37.0212 mg/ml.

เปลี่ยนเป็น g/ml. จะได้ $\frac{37.0212}{1,000}$ = 0.0370 g/ml.

ถ้ากากถั่วเหลืองสกัดที่ถูกทำให้เข้มข้นปริมาตร 1 ml. มีน้ำตาลรีดิวซ์ = 0.0370 g/ml.

แล้วกากถั่วเหลืองสกัดที่ถูกทำให้เข้มข้นปริมาตร 110 ml. จะมีน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ

110 x 0.0370 = 4.0723 g/ml.

- ดังนั้นใน 2,000 กรัมของกากถั่วเหลืองเปียก จะมีน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 4.0723 กรัมต่อมิลลิลิตร

ถ้า 10 กรัมของกากถั่วเหลืองเปียก = 8.6713 กรัมของกากถั่วเหลืองแห้ง

แล้ว 2,000 กรัมของกากถั่วเหลืองเปียก มีกรัมของกากถั่วเหลืองแห้ง $\frac{(2,000 \times 8.6713)}{10}$ = 1,734.26 g/g

ถ้า 2,000 กรัมของกากถั่วเหลืองเปียก มีน้ำตาลรีดิวซ์ = 4.0723 g/ml.

แล้ว 1,734.26 กรัมของกากถั่วเหลืองแห้ง จะมีน้ำตาลรีดิวซ์ $\frac{(1,734.26 \times 4.7023)}{2,000}$ = 3.5312 g/g

ถ้า 1,734.26 กรัมของกากถั่วเหลืองแห้ง มีน้ำตาลรีดิวซ์ = 3.5312 g/g

แล้ว 1 กรัมของกากถั่วเหลืองแห้ง จะมีน้ำตาลรีดิวซ์ $\frac{(1 \times 3.5312)}{1,734.26}$ = 0.0020 g/g

- ดังนั้น ในตัวอย่าง กากถั่วเหลือง 1 กรัม จะมีน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.0020 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวกุลิสรา ไชยวัฒนานนท์
วัน เดือน ปี เกิด	21 มิถุนายน 2540
ประวัติการศึกษา	ปีการศึกษา 2561 ระดับการศึกษาระดับปริญญาตรี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม ปีการศึกษา 2557 มัธยมศึกษาตอนปลายศึกษา โรงเรียนเตรียมอุดมศึกษาน้อมเกล้า แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์-คอมพิวเตอร์
ประสบการณ์การทำงาน	พฤษภาคม 2561 – กรกฎาคม 2561 บริษัท ซีพีแรม จำกัด (นักศึกษาฝึกงาน)
และผลงานวิจัย	ผลของแหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลืองต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกและจุลินทรีย์ก่อโรค
ชื่อ-นามสกุล	นางสาวฐิตาพร ศิริมงคล
วัน เดือน ปี เกิด	16 มิถุนายน 2539
ประวัติการศึกษา	ปีการศึกษา 2561 ระดับการศึกษาระดับปริญญาตรี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม ปีการศึกษา 2557 มัธยมศึกษาตอนปลายศึกษา โรงเรียนสิริรัตนาธร แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์
ประสบการณ์การทำงาน	พฤษภาคม 2561 – มิถุนายน 2561 บริษัท แนทฟู้ดส์ จำกัด (นักศึกษาฝึกงาน)
และผลงานวิจัย	ผลของแหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลืองต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกและจุลินทรีย์ก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวรชดา วงศ์จารุวรวิทย์
วัน เดือน ปี เกิด	5 สิงหาคม 2539
ประวัติการศึกษา	ปีการศึกษา 2561 ระดับการศึกษาระดับปริญญาตรี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม ปีการศึกษา 2557 มัธยมศึกษาตอนปลายศึกษา โรงเรียนอัสสัมชัญศึกษา แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์
ประสบการณ์การทำงาน	พฤษภาคม 2561 – มิถุนายน 2561 บริษัท ไพร์ม โปรดักส์ อินดัสตรี้ (นักศึกษาฝึกงาน)
และผลงานวิจัย	ผลของแหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลืองต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มแล็คติกและจุลินทรีย์ก่อโรค

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้