การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากถั่วเน่า

ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM FERMENTED SOYBEAN

ธัญญรัตน์ สีทองธนะวัฒน์
นภัสวรรณ ช่อช้าง

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM FERMENTED SOYBEAN

THUNYARAT SITHONGTANAWAT
NAPHATSAWAN CHOCHANG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY) DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากถั่วเน่า

Isolation of lactic acid bacteria from fermented soybean

ชื่อนักศึกษา นางสาว ธัญญรัตน์ สีทองธนะวัฒน์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 62050604

นางสาว นภัสวรรณ ช่อช้าง นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 62050606

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดร. กานต์ วงศาริยะ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	**ลายมือชื่อ**
รศ.ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร. วิภาวี เดชติศักดิ์ กรรมการ	
ผศ.ดร. กานต์ วงศาริยะ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากถั่วเน่า
Isolation of lactic acid bacteria from fermented soybean

ชื่อนักศึกษา นางสาว ธัญญรัตน์ สีทองธนะวัฒน์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 62050604
นางสาว นภัสวรรณ ช่อช้าง นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 62050606
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2565
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดร. กานต์ วงศาริยะ

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่าที่มีความสามารถในการสร้างกรดแลคติกและสามารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปาก อันได้แก่ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* ซึ่งจากการทดลองสามารถคัดแยกได้แบคทีเรียกรดแลคติก ทั้งหมด 33 ไอโซเลท จากตัวอย่างถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองจำนวน 20 ไอโซเลท และจากตัวอย่างถั่วมาแฮะจำนวน 13 ไอโซเลท จากนั้นนำมาจัดกลุ่ม และคัดเลือมาได้ 10 ไอโซเลท ได้แก่ RB1-5 RB1-8 RB1-9 RB1-10 RB1-13 RB1-19 RB2-4 RB2-5 RB2-6 และ RB2-13 มีจำนวน 5 ไอโซเลทที่สามารถสร้างก๊าซในหลอดดักแก๊สได้ คือ RB1-10, RB1-11, RB1-12, RB1-13 และ RB2-6 และเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปากจากทั้งหมด 10 ไอโซเลท พบว่า RB2-4 และ RB2-6 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในช่องปากได้ดีที่สุด

คำสำคัญ : แบคทีเรียแกรมบวก, แบคทีเรียกรดแลคติก, ถั่วเน่า, เชื้อก่อโรคในช่องปาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM FERMENTED SOYBEAN		
Student	Miss Thunyarat	Sithongtanawat	ID 62959604
	Miss Naphatsawan	Chochang	ID 62050606
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
School	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2022		
Advisor	Asst.Prof.Dr. Karn Wongsariya		

Abstract

This special project aims to isolate bacteria from rotten beans that can product lactic acid and inhibit the growth of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. In the experiment, 33 isolates of lactic acid bacteria were obtained from fermented bean for 20 isolates and fermented pigeon pea for 13 isolates. The selected isolates namely RB1-5, RB1-8, RB1-9, RB1-10, RB1-13, RB1-19, RB2-4, RB2-5, RB2-6, and RB2-13, which have 5 isolates that can generate gas in gas trap tubes, namely RB1-10, RB1-11, RB1-12, RB1-13, and RB2-6. And when testing the antibacterial activity of all 10 strains, it was found that RB2-4 and RB2-6 had the best inhibitory effects on the growth of oral pathogens.

Keywords : Gram positive bacteria, Lactic acid bacteria, Oral pathogens

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานฉบับนี้ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.กานต์ วงศาริยะ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และตรวจแก้ไขเล่มนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ทำให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีขอขอบคุณอาจารย์ รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา และ ผศ.ดร. วิภาวี เดชติศักดิ์ ที่ให้ ความอนุเคราะห์ในการเป็นกรรมการสอบโครงงานพิเศษ รวมถึงตรวจแนะนำการแก้ไขรูปเล่มโครงงานให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์และบุคลากรสาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและ บุคลากรจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ และสั่งสอนให้ความรู้ในด้านต่างๆ ตลอดจนความอนุเคราะห์เครื่องมือ สารเคมี และอุปกรณ์ต่างๆ

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ จนสำเร็จลุล่วงและเพื่อนๆ ที่คอยสนับสนุน แนะนำ และเป็นกำลังใจจนทำให้สำเร็จการศึกษาไปได้ด้วยดี

ธัญญรัตน์ สีทองธนะวัฒน์
นภัสวรรณ ช่อช้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 2
1.2 วัตถุประสงค์ 3
1.3 ขอบเขต 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 ถั่วเน่า (Fermented soybean) 4
2.2 แบคทีเรียแลคติก 4
2.3 แบคทีเรียแลคติกที่พบในอาหารหมักชนิดต่างๆ 5
2.3.1 ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ 5
2.3.2 ผลิตภัณฑ์นม 6
2.3.3 อาหารหมักจากพืช 6
2.3.3.1 ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากธัญพืช 6
2.3.3.2 ผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดผักและผลไม้ 6
2.4 ประโยชน์ของแบคทีเรียแลคติกที่มีต่ออาหารหมัก 7
2.5 เชื้อที่ใช้ทดสอบ 8
2.5.1 *Streptococcus mutans* 8
2.5.2 *Streptococcus sobrinus* 9
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 11
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 14
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 21
เอกสารอ้างอิง 22

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

ภาคผนวก 24
ภาคผนวก ก 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.2 คุณสมบัติของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้..... 17

4.3 ผลการทดสอบ การออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในช่องปาก โดยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลคติกได้..... 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 *Streptococcus mutans* 8
2.2 *Streptococcus sobrinus* 9
4.1 ลักษณะเชื้อที่แยกได้จากถั่วเน่า 14
4.1 การสร้างแก๊สในหลอดอาหาร และการทดสอบการเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน..... 16
4.3 การติดสีแกรมและการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
MRS	De Man Rogosa and Sharpe
BHI	Brain Heart Infusion
mL	millilitre
RB1	Rotten beans from soy beans
RB2	Rotten beans from pigeon pea
$CaCO_3$	Calcium carbonate
Ø	Diameter
S. mutans	***Streptococcus mutans***
S. mutans	*Streptococcus sobrinus*
pH	positive potential of the hydrogen ions

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ถั่วเน่าเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านที่พัฒนามาจากภูมิปัญญาชาวบ้านทางภาคเหนือที่ถ่ายทอดสืบต่อกันมา เป็นอาหารพื้นบ้านที่อยู่คู่มากับชาวล้านนามาเป็นเวลานาน มีถิ่นกำเนิดมาจากชาวไทยภูเขา ชาวไทลื้อ และไทยใหญ่ มีคุณค่าทางวัฒนธรรมและวิถีชีวิตความเป็นอยู่ของคนล้านนา สามารถเสริมสร้างรายได้ให้กับคนในชุมชน นิยมบริโภคกันในเขตภาคเหนือของประเทศไทย เช่น เชียงใหม่ เชียงราย แพร่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง เป็นต้น โดยให้คุณค่าทางโภชนาการสูง ถือเป็นแหล่งโปรตีน และกรดอะมิโน ที่ช่วยในการดูดซึมและร่างกายสามารถย่อยสลายได้ง่ายมีประโยชน์ต่อร่างกาย เหมาะสำหรับผู้ที่รับประทานอาหารมังสวิรัติ และบุคคลทั่วไป การหมักถั่วเน่าจัดเป็นการถนอมอาหารรูปแบบหนึ่งเพื่อให้อาหารมีอายุการเก็บที่รักษายาวนานขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องปรุงรสแทนกะปิและเป็นส่วนประกอบที่ช่วยเพิ่มรสชาติกลมกล่อมให้กับอาหารพื้นเมือง เช่น น้ำพริกอ่อง ขนมจีนน้ำเงี้ยว หรือห่อใส่ใบตองแล้วนำมานึ่งหรือปิ้งให้สุกรับประทานคู่กับข้าวเหนียว ถั่วเน่ามีลักษณะคล้ายคลึงกับถั่วเหลืองหมักพื้นเมืองที่พบได้ตามประเทศต่างๆ เช่น คิเนมา (kinema) ประเทศเนปาล, เทมเป้ (temphe) ประเทศอินโดนีเซีย, ดาวาดาวา (dawadawa) หรือ อิรู (iru) ประเทศแอฟริกา และ นัตโตะ (natto) จากประเทศญี่ปุ่น แต่มีความแตกต่างที่กระบวนการและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต เช่น นัตโตะจากประเทศญี่ปุ่นจะใช้ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ที่ถูกคัดสรรมาเป็นอย่างดี มาใช้ในกระบวนการหมักทำให้ได้รสชาติที่เป็นมาตรฐานของการหมักในแต่ละครั้ง แต่สำหรับถั่วเน่าที่หมักโดยชาวบ้านของไทยจะอาศัยเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมที่เป็นเชื้อแบบผสม (mixed cultures) มาใช้ในการหมักทำให้รสชาติที่ได้จากการหมักในแต่ละครั้งนั้นอาจมีความแตกต่างกัน และทำให้มีจุลินทรีย์ที่มีส่วนช่วยในกระบวนการหมักที่หลากหลายซึ่งอาจเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้เช่นกัน

ถั่วเน่าจัดเป็นแหล่งโภชนาการของโปรตีน และกรดอะมิโนที่มีราคาถูกกว่าเนื้อสัตว์ อุดมไปด้วยจุลินทรีย์โปรไบโอติกซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพช่วยในการย่อยอาหารและทำให้ลำไส้สามารถดูดซึมสารอาหารเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายยิ่งขึ้น ป้องกันลำไส้จากสารพิษและแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย สามารถเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน โดยจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่พบในถั่วเน่านั้นมีส่วนช่วยในการลดความเสี่ยงในการติดเชื้อและทำให้ฟื้นตัวได้เร็วขึ้นเมื่อมีอาการเจ็บป่วย นอกจากนี้ในถั่วเน่ายังอุดมไปด้วย วิตามินซี ธาตุเหล็ก สังกะสี และแร่ธาตุอื่นๆ ซึ่งมีส่วนช่วยในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยชะลอความแก่และรักษาสมดุลของไขมันและน้ำบริเวณผิวหนังเนื่องจากมีวิตามินอี และสาร lecithin ที่พบในถั่วเน่าสูง โดยคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเน่านั้นเกิดจากการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในระหว่างกระบวนการหมักของถั่วเน่าซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางด้านกายภาพและชีวเคมีของผลิตภัณฑ์อาหารหมักนี้ โดยมีรายงานวิจัยที่ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่สร้างจากแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัส *Bacillus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือเผยแพร่ต่อสาธารณะ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

ที่มีส่วนช่วยในการหมักถั่วเน่าเป็นส่วนใหญ่ ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโภชนาการในผลิตภัณฑ์ของถั่วหมัก โดยเอนไซม์โปรติเอสนี้มีบทบาทสำคัญในการย่อยโปรตีนในขั้นตอนของกระบวนการหมักถั่วเน่าได้เป็นสายเปปไทด์สายสั้นลง และกรดอะมิโนทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรสชาติเฉพาะเป็นเอกลักษณ์ของอาหารหมักและเนื่องจากแบคทีเรียในกระบวนการหมักต้องการใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน ทำให้มีค่า pH สูงขึ้นจากการสะสมของแอมโมเนีย ซึ่งอาจทำให้เกิดการระเหยของแอมโมเนียจนเกิดกลิ่นฉุนขึ้น นอกจากนี้สายพันธุ์ของถั่วเหลืองที่ใช้ในการหมักและวิธีการผลิตของกระบวนการอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของคุณค่าทางโภชนาการได้เช่นเดียวกัน

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักถั่วเน่านั้นมีส่วนสำคัญต่อผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าเป็นอย่างมาก โดยนอกจากจะมีส่วนช่วยทำให้อาหารหมักหรือถั่วเน่ามีรสชาติที่ดีและคุณค่าทางโภชนาการที่สูงแล้วนั้นจุลินทรีย์เหล่านี้ยังมีบทบาทสำคัญที่ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่ส่งผลทำให้ถั่วเน่ามีประโยชน์ต่อร่างกายเมื่อได้รับประทานเข้าไป อาทิเช่น การต้านสารอนุมูลอิสระ หรือความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น เป็นต้น และเนื่องจากการหมักถั่วเน่าเป็นการหมักที่ใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นกรรมวิธีการหมักแบบพื้นบ้านที่ได้กล่าวไปข้างต้น ซึ่งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักนี้ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัส *Bacillus* ที่มีความสามารถในการทนความร้อนสูง มีส่วนช่วยในการสร้างเอนไซม์ไซม์โปรติเอส (protease) มาย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลืองให้มีหน่วยที่เล็กลง ได้แก่ เปปไทด์ที่สายสั้นลง และกรดอะมิโนในกระบวนการหมัก และยังทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของถั่วเน่าเพิ่มสูงขึ้นซึ่งสาเหตุมาจากการทำให้เกิดสารประกอบเอมีนอิสระหรือที่อยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียมสำหรับชนิดของแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัสนี้ที่มีรายงานพบในกระบวนการหมักถั่วเน่า ได้แก่ *B.subtillus, B.pumilus, B.magaterium, B.licheniformis* และ *B.thermocatenulatus* (เกตุการ และคณะ, 2554) นอกจากจุลินทรีย์ในจีนัสของ *Bacillus* ที่พบในกระบวนการหมักถั่วเน่าเป็นส่วนใหญ่แล้วยังมีรายงานว่าพบจุลินทรีย์ในกลุ่ม lactic acid bacteria ที่มีส่วนช่วยในกระบวนการหมักของถั่วเน่าเช่นกัน ซึ่งทำให้มีคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระเป็นผลมาจากการที่จุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักสามารถย่อยสลายโปรตีนหรือสับสเตรตบางชนิด เช่น เคซีน ซึ่งทำให้มีการผลิตเปปไทด์และกรดอะมิโนออกมาเป็นจำนวนมาก ซึ่งสายเปปไทด์และกรดอะมิโนที่ผลิตออกมานี้มีส่วนช่วยในการต้านสารอนุมูลอิสระ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกนี้พบว่ามีส่วนช่วยในกระบวนการหมักของอาหารหลากหลายประเภท เช่น อาหารประเภทเครื่องดื่ม เนื้อหมัก หรือ ผักดอง เป็นต้น ซึ่งมีความสามารถในการสร้างสารที่ให้กลิ่น รสชาติเนื้อสัมผัสที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นแบบเอกลักษณ์เฉพาะตัวให้กับอาหารหมัก โดยการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ส่งผลต่อคุณค่าทางอาหารแต่อย่างใด และยังสามารสร้างสารที่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นอีกด้วย ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกนี้เมื่อรับประทานเข้าไปแล้วทำให้มีประโยชน์ต่อร่างกาย อาทิเช่น ช่วยในการดูดซึมเกลือแร่และธาตุเหล็ก ช่วยในการย่อยอาหาร ลดคอเรสเตอรอลในเลือด ลดเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง และยังช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น แบคทีเรียแลคติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive) ที่ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ไม่สร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์แคตาเลส (catalase negative) มีรูปร่างทางสัณฐานวิทยาเป็นรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม สามารถสร้างกรดแลคติก ส่วนมากแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศนั้นก็สามารถอยู่รอดได้ นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังมีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติก (Probiotic) ที่จัดได้ว่าเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายเป็นอย่างมาก ซึ่งมีความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดีที่ทำให้มีชีวิตอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหารซึ่งเป็นคุณบัติที่สำคัญของจุลินทรีย์ในกลุ่มโปรไบโอติก รวมทั้งยังสามารถสร้างกรดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแบคเทอริโอซินในการต่อต้านและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคได้อีกด้วย และเนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้รับการพิจารณาว่าเป็น GRAS (Generally Recognized As Safe Organisms) ที่ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยสูงต่อมนุษย์ และสัตว์ การที่จะนำกลุ่มแบคทีเรียในกลุ่มนี้มาใช้เป็นโปรไบโอติก ไม่ว่าจะเป็นทั้งในด้านการแพทย์ โดยอาจนำมาแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ หรือในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ แทนการใช้สารเคมีที่อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพร่างกายแล้ว จึงมีความปลอดภัยสูง อีกทั้งยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการศึกษา การคัดแยก ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี จัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกและ การออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในช่อปากจากผลิตภัณฑ์หมักถั่วเน่า เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและอาจนำไปใช้ต่อยอดได้ในหัวข้องานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียกรดแลคติกต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1) เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์หมักถั่วเน่า

2) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก ***Streptococcus mutans*** และ *Streptococcus sobrius*

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1) การศึกษานี้จะทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในตัวอย่างถั่วเน่าที่ทำจากถั่วเหลืองและตัวอย่างถั่วเน่าที่ทำจากถั่วมาแฮะ

2) การศึกษานี้จะนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากถั่วเน่าที่คัดแยกได้ ไปทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลลินทรีย์ก่อโรคในช่องปาก ***Streptococcus mutans*** และ *Streptococcus sobrinus*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์หมักถั่วเน่า

2) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก ***Streptococcus mutans*** และ *Streptococcus sobrinus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ถั่วเน่า (Fermented soybean)

ถั่วเน่าเป็นอาหารพื้นบ้านที่นิยมรับประทานกันทางภาคเหนือของประเทศไทยมาอย่างยาวนาน โดยมีทั้งจำหน่ายตามท้องตลาดหรือทำเก็บไว้บริโภคเองตามครัวเรือน ซึ่งนับว่าเป็นวิถีและภูมิปัญาดั้งเดิมที่ได้ทำสืบต่อกันมาอย่างยาวนาน ซึ่งการทำถั่วเน่าจะใช้วิธีการหมักกับจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ซึ่งถือว่าการเป็นการแปรรูปอาหารอย่างหนึ่งเพื่อเก็บรักษาและยืดอายุของอาหารให้ยืนยาวมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ในถั่วเน่ายังอุดมไปด้วยคุณประโยชน์ สารอาหารมากมายไม่ว่าจะเป็น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ โดยเมื่อเทียบราคากับอาหารทั่วไปที่ให้สารอาหารเหล่านี้เหมือนกัน นับว่าถั่วเน่าเป็นแหล่งสารอาหารที่มีราคาถูกกว่ามาก และถั่วเน่ายังมีประโยชน์ในการช่วยเพิ่มรสชาติให้กับอาหารประเภทมังสวิรัติให้มีความกลมกล่อมมากยิ่งขึ้นอีกด้วย โดยส่วนใหญ่ในการหมักถั่วเน่านั้นจะพบเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ในกระบวนการหมักมากที่สุด แต่ด้วยการหมักถั่วเน่าโดยวิธีธรรมชาตินั้นเราอาจจะพบแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่มีส่วนช่วยในการหมักหรือสามารถอยู่รอดจนได้เป็นผลิตภัณฑ์ โดยมีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียแลคติกเช่นเดียวกัน ซึ่งพบรายงานวิจัยที่ได้ศึกษาคุณสมบัติโปรไบโอติกจากอาหารถั่วเหลืองหมักตามธรรมชาติของเทือกเขาหิมาลัยตะวันออก ซึ่งสามารถคัดแยกจุลินทรีย์โปรไบโอติกได้ทั้งหมด 352 ชนิด จากอาหารหมักถั่วเหลือง จากนั้นจึงได้นำมาทำการคัดแยกเชื้อ Lactic acid bacteria ได้แปดสายพันธุ์ ที่มาจากเชื้อจุลินทรีย์ Enterococcus spp. และ Pediococcus spp. แบคทีเรียแลคติกจัดอยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ที่มีส่วนช่วยในการปรับสมดุลในระบบย่อยอาหาร สามารถสร้างสารป้องกันเชื้อโรค และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในร่างกายได้หลายชนิดอีกด้วย

2.2 แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria : LAB) เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ตามธรรมชาติและในอาหารหมักที่หลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่ได้รับการปนเปื้อนมาจากผลผลิตหรือผลิตภัณฑ์ที่มาจากทางการเกษตร หรือเครื่องมือที่ใช้แปรรูปผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non-motile) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) และไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส (catalase negative)ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าแบคทีเรียแลคติกมีลักษณะรูปร่างเป็นแท่งและทรงกลม

ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาในการนำแบคทีเรียแลคติกมาใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตอาหารหมักชนิดต่างๆ (สุรัตน์, 2557)

โดยในการผลิตอาหารหมักชนิดต่างๆได้มีการนำแบคทีเรียแลคติกมาใช้ในการหมัก ซึ่งแบคทีเรียแลคติกจะเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารหมักเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กรดแลคติก เอธทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยใช้แบคทีเรียแลคติกในการหมัก ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นรสเฉพาะตัว และอาจจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความสารมารถในการสร้างสารต่อต้านและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น แบคเทอริโอซิน ดังนั้นในกระบวนการของการผลิตอาหารหมักระดับอุตสาหกรรมจึงต้องมีการควบคุมมาตรฐานกล้าเชื้อ ที่จะต้องเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีความเป็นพิษไม่ก่อให้เกิดโรค เป็นเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นหรือปนเปื้อนสารเคมีที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพได้ (สุรัตน์, 2557) กระบวนการหมักที่เกิดกรดจากแบคทีเรียแลคติก มี 2 กระบวนการ ได้แก่

1. Homolactic fermentation เป็นกระบวนการหมักที่ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติกโดยโมเลกุลกลูโคสหนึ่งโมเลกุลจะเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกสองโมเลกุล เช่น *Lb. plantarum* (สุรัตน์, 2557)

2. Heterolactic fermentation เป็นกระบวนการหมักที่จะเกิดกรดแลคติกได้เพียงร้อยละ 50 เท่านั้น โดยโมเลกุลกลูโคสหนึ่งโมเลกุลจะสร้างเอธทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ หรือกรดอะซิติก เช่น *Leuconostoc mesenteroides* (สุรัตน์, 2557)

2.3 แบคทีเรียแลคติกที่พบในอาหารหมักชนิดต่างๆ

2.3.1 ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์

ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ซึ่งมักจะพบแบคทีเรียแลคติก ชนิด *Lactobacillus sp. และ Pediococcus sp.* โดยได้มีการนำเชื้อชนิดนี้มาใช้ในทางการค้าของเนื้อผลิตภัณฑ์ในต่างประเทศ นอกจากนี้ยังพบ *L. plantarum และ L. brevis* ซึ่งเชื้อดังกล่าวมีการผลิตกรดอินทรีย์ออกมาทำให้เกิด pH ในสภาวะที่ไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ บางผลิตภัณฑ์ใช้แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนเทรตเป็นไนไทร์ต ทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีที่คงทนมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกยังช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดก่อโรคและช่วยยืดอายุการเก็บรักษาให้นานยิ่งขึ้น ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยในการบริโภค (กนกวรรณ, 2560) และ ผลิตภัณฑ์จากปลา เช่น ปลาร้า ปลาเค็ม ปลาส้มฟัก แบคที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรินแลคติกที่พบ ได้แก่ *L. plantarum, L. pentosus, Streptococcus sp., Leuconostoc sp.* และ *Pediococcus acidococcus* เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการทนเกลือได้ดี และเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวข้องในการหมักน้ำปลา มีส่วนช่วยในการส่งเสริมรสชาติของอาหารหมัก (กนกวรรณ, 2560)

2.3.2 ผลิตภัณฑ์นม

ผลิตภัณฑ์นม ที่มีการใช้แบคทีเรียแลคติกในการหมัก คือ นมเปรี้ยว ซึ่งพบแบคทีเรีย ได้แก่ *L.acidophilus* และ *L.bifidus* โยเกร์ต พบแบคทีเรีย *L.bulgaricus, Bifidobacterium sp.* หลักในการหมักนมของแบคทีเรียแลคติก คือ การสร้างกรดแลคติกในกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์นม โดยค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์นมจะลดลงจนทำให้เกิดการจับตัวกันของโปรตีนในนมหมัก เรียกว่า เคิร์ด (curd) ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการหมักออกมาแล้ว จะได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีรสเปรี้ยว (กนกวรรณ, 2560)

2.3.3 อาหารหมักจากพืช

2.3.3.1 ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากธัญพืช

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากธัญพืช เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวในกระบวนการหมักสามารถพบได้หลายกลุ่ม ได้แก่ ยีสต์ รา และแบคทีเรีย โดยผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากถั่วเหลืองในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ เช่น ซีอิ๊ว หรือเต้าเจี้ยว มักใช้เชื้อราบริสุทธิ์ในการหมัก ซึ่งในระหว่างกระบวนการหมักอาจมีการเติมเชื้อยีสต์หรือแบคทีเรียแลคติกลงไป เพื่อช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสที่ดียิ่งขึ้น ซึ่งแบคทีเรียแลคติกที่มักจะพบ คือ *P.halophilus* และ *Lactobacillus* sp. ในอาหารผลิตภัณฑ์ประเภทถั่วหมัก เช่น natto, you-shin และ Tao-si จากญี่ปุ่นที่เป็นอาหารหมักประเภทที่ใช้ถั่วเหลืองและแป้งข้าวสาลีในการหมัก มักจะพบแบคทีเรียแลคติก *Streptococcus* sp., และ *Pediococcus* sp. (กนกวรรณ, 2560)

2.3.3.2 ผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดผักและผลไม้

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดผักและผลไม้ดอง เป็นการถนอมอาหารรูปแบบหนึ่งที่มีมาอย่างยาวนาน เพื่อเก็บรักษายืดอายุการบริโภคอาหารให้นานยิ่งขึ้น ในการดองนอกจากจะเป็นการถนอมอาหารแล้วยังทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะตัวที่น่ารับประทานสำหรับผู้ที่ชื่นชอบผลิตภัณฑ์อาหารดองอีกด้วย ในการดองจะใช้แบคทีเรียแลคติกเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides, L.plantarum, L.brevis, L.buchineri, L.fermentum* และ *Pediococcus cerevisiae* โดยจะนิยมนำผัก เช่น แตงกวา กะหล่ำปลี หน่อไม้ หรือ ผักกาด มาดองเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองในการบริโภค (กนกวรรณ, 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ประโยชน์ของแบคทีเรียแลคติกที่มีต่ออาหารหมัก

กระตุ้นการเกิดภูมิคุ้มกัน มีคุณสมบัติเป็น antitumor สามารถต้านทานและยับยั้งต่อเชื้อก่อโรค มีความไวต่อ macrophage และ lymphocyte ที่ทำให้ระดับของ immunoglobulin (lgA) เพิ่มขึ้นและสามารถผลิต gamma interferon ที่ทำให้มีความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรคได้ (กนกวรรณ, 2560)

ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นตัวก่อโรค โดยการสร้างกรดอินทรีย์ ลดค่า pH และสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ เช่น แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นสารประเภทโพลีเปปไทด์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่มีความใกล้เคียงกันได้ และแบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์จะมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นเชื้อก่อโรคที่แตกต่างกัน (กนกวรรณ, 2560)

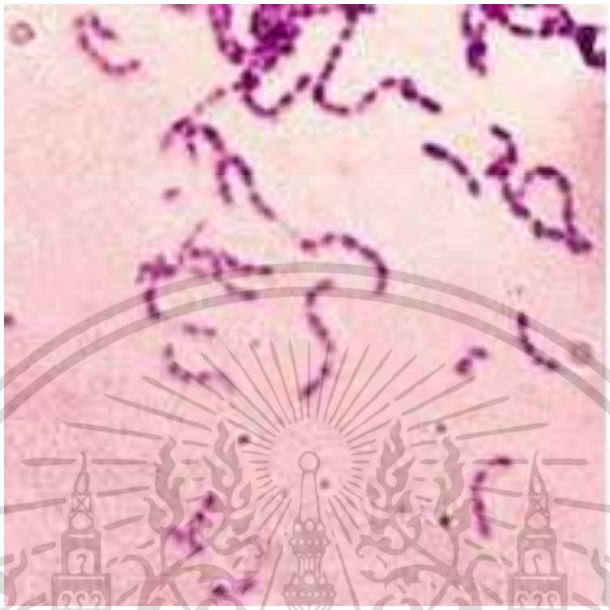
การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ คุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์อาหารสามารถเพิ่มขึ้น กิจกรรมในการหมักในระหว่างขั้นตอนของกระบวนการผลิต โดยการเพิ่มจำนวนองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นและยังเพิ่มคุณค่าอาหารทางด้านโปรตีนที่มีส่วนของธัญพืชและถั่ว นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญในระหว่างกระบวนการหมัก จึงทำให้องค์ประกอบของวิตามินในผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านการหมักมีค่าสูงกว่าในผลิตภัณฑ์อาหารที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการหมัก (กนกวรรณ, 2560)

ป้องกันการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะ *L.acidophilus* ที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ มีการศึกษาการบริโภคอาหารประเภทเนื้อแดง ว่าจะทำให้ระดับของเอนไซม์ β- glucuronidase, azoreductase และ introreductase เพิ่มสูงขึ้นกว่าการบริโภคอาหารประเภทผัก นอกจากนี้เอนไซม์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของ procarcinogen ไปเป็น carcinogen ของส่วนปลายลำไส้ ที่ *L.acidophilus* สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซน์เหล่านี้ จึงทำให้ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลงได้ (กนกวรรณ, 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 เชื้อที่ใช้ทดสอบ

2.5.1 *Streptococcus mutans*



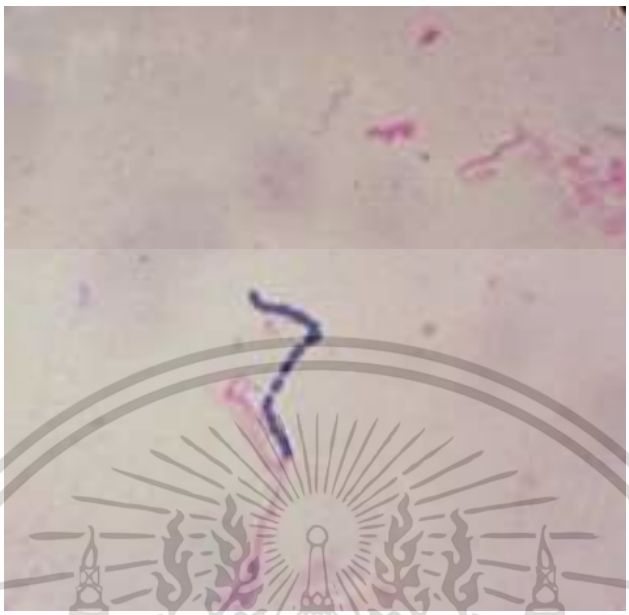
รูปที่ 2.1 *Streptococcus mutans*

ที่มา : https://www.ijmronline.org/journal-article-file/632

Streptococcus mutans เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ไม่ได้ เป็นแบคทีเรียในสภาวะกึ่งออกซิเจน พบโดยทั่วไปในช่องปากและเป็นสาเหตุของฟันผุ สปีชีส์ที่ใกล้เคียงกับ *Streptococcus mutans* คือ *Streptococcus sobrinus* ซึ่งเป็นแบคที่เรียที่ทำให้เกิดโรคฟันผุทั้งคู่ บางครั้งจึงเรียกรวมกันว่า *mutans streptococci*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 *Streptococcus sobrinus*



รูปที่ 2.2 *Streptococcus sobrinus*

ที่มา : https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_sobrinus

Streptococcus sobrinus เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ไม่ได้ มีผล คาตาเลสลบ และไม่ใช้ออกซิเจน การเจริญเติบโตที่เหมาะสมคือ 37°C เจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดเล็กน้อยที่ค่าpH 6.3 เป็นแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ส่งเสริมการก่อตัวของโรคฟันผุในฟัน โดยการสร้างไบโอฟิล์มจากส่วนผสมของน้ำตาลทำให้เกิดคราบจุลินทรีย์ อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับโรคฟันผุในเด็กปฐมวัย ซึ่งเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ของฝีในฟัน และปวดฟันในเด็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รัชนีย์วัล ภิรมวงศ์ (2554) ถั่วเน่าเป็นอาหารหมักพื้นเมืองของทางภาคเหนือของประเทศไทย ทำจากถั่วเหลืองที่ผ่านการต้มสุกแล้วนำมาหมักด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติจนมีกลิ่น สี รส และลักษณะเฉพาะตัว

Pynhunlang Kharnaior และ Jyoti Prakash Tamang (2566) การศึกษาคุณสมบัติโปรไบโอติกจากอาหารถั่วเหลืองหมักตามธรรมชาติของเทือกเขาหิมาลัยตะวันออก ซึ่งสามารถคัดแยกจุลินทรีย์โปรไบโอติก ได้ทั้งหมด 352 ชนิดจากอาหารถั่วเหลืองหมัก แล้วนำมาทำการคัดแยกเชื้อ Lactic acid bacteria

สุรรัตน์ วังพิกุล (2557) แบคทีเรียแลคติก เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ตามธรรมชาติและในอาหารหมักหลายชนิด ทำให้อาหารหมักมีกลิ่นรสเฉพาะตัว และกระบวนการหมักที่เกิดกรดจากแบคทีเรียแลคติก

YS Ismail และคณะ (2561) แบคทีเรียกรดแลคติกไม่ผลิตเอนไซม์คะทาเลสที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำและออกซิเจน แบคทีเรียบางชนิดต้องการออกซิเจนเพื่อสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการเผาผลาญแอโรบิกที่เป็นพิษ ในขณะที่แบคทีเรียกรดแลคติกไม่ต้องการออกซิเจน เพราะมันรวมอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน

Indriana และคณะ (2563) การเติม $CaCO_3$ ในอาหาร MRS คือการคัดแยกแบคทีเรียที่ไม่สร้างกรดแลคติกออกไป ซึ่งระบุได้จากการเกิดโซนใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย $CaCO_3$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำปฏิกิริยากับกรดแลกติกที่สร้างโดยแบคทีเรีย เกิดเป็นแคลเซียมแลคเตตซึ่งละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เกิดเป็นโซนใสรอบๆ โคโลนี

Maoyang และคณะ (2559) แบคทีเรียที่ได้รับจากช่องปากสามารถตั้งรกรากในลำไส้และยังคงอยู่ในนั้น ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้และเกิดการอักเสบเรื้อรัง ซึ้งเป็นการกระตุ้นให้เกิดโรคในทางเดินอาหารให้มีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น และจุลินทรีย์ในช่องปากสามารถส่งผลต่อสุขภาพร่างกายผ่านการย่อยอาหาร บางประเภท ปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ รูปแบบอาหาร (มังสวิรัติหรือไม่ก็ได้) และสารสกัดจากอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

- *Streptococcus mutans*
- *Streptococcus sobrinus*

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- De Man, Rogosa and Sharpe agar
- Brain heart infusion
- Skim milk agar

3.1.3 สารเคมี

- Paraffin oil
- Calcium carbonate
- 3% Hydrogen peroxide
- Ethanol Alcohol 95%
- Crystal violet
- Safranin
- Gram iodine

3.1.4 อุปกรณ์

- Plate
- Dropper
- 250 ml Erlenmeyer flask
- Spreader
- Autoclave
- Loop
- Pipette
- Durham Tube
- Cork borer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Eppendorf tube
- 10 ml Test Tube
- 100 ml Cylinder
- Laminar air flow
- Vernier caliper

3.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและทำให้เชื้อบริสุทธิ์

กำหนดรหัสตัวอย่างถั่วเน่าที่ทำจากถั่วเหลืองเป็น RB1 และตัวอย่างถั่วเน่าที่ทำจากถั่วมาแฮะเป็น RB2 นำตัวอย่างทั้งสองมาเลี้ยงในอาหารเหลว De Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS broth) 50 mL. ในฟลาสก์ปริมาตร 250 mL.อย่างละฟลาสก์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสดูระยะเวลาที่พบการเจริญของเชื้อมากที่สุดโดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง แล้วนำมาทำการเจือจางแบบ Serial dilution 10 เท่า จากนั้นนำตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วมา Spread ลงบนอาหาร MRS agar ที่เติม 0.35% $CaCl_3$ (Calcium carbonate) เพื่อดูการสร้างกรดแลคติก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตโซนใสโดยรอบของโคโลนี ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีโซนใสแล้วนำไป Streak ลงบนอาหาร 1/2MRS agar + 0.35% $CaCl_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้เชื้อบริสุทธิโดยการ Streak ซ้ำและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนได้ Single colony

3.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี

3.2.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส

ใช้ลูปเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่นสไลด์แล้วหยด 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สังเกตว่ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นหรือไม่ ถ้าหากมีฟองแก๊สเกิดขึ้นจะให้ผลเป็นบวกและถ้าไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้นให้ผลเป็นลบ

3.2.2 การทดสอบการสร้างแก๊สและการเจริญโดยไม่ใช้ออกซิเจน

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแลคติกจาก MRS agar ปริมาตร 1 ลูปลงใน MRS broth 10 mL. ที่มีหลอดดักแก๊สอยู่และอีกหลอดหลังจากที่เขี่ยเชื้อแลคติก 1 ลูปลงใน MRS broth แล้ว ให้ปิเปต Paraffin oil 1 mL. ลงบนผิวหน้าอาหารจากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 เป็นเวลา24 ชั่วโมง สังเกตอาหารที่มีหลอดดักแก๊สถ้ามีอากาศอยู่ในหลอดดักแก๊สให้ผลเป็นบวก และในอาหารที่มี Paraffin oil อยู่บนผิวหน้าอาหาร สังเกตว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้หรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การย้อมสีแกรม

ใช้ลูปเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบแตะลงบนสไลด์ แล้วย้อมด้วยชุดสีย้อมแกรม ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x โดยใช้ immersion oil หยดลงบนแผ่นสไลด์แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3 ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus*

เจือจางเชื้อ Pathogen ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 นำไม้พันสำลีปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อ Pathogen เกลี่ยลงบนอาหาร BHI agar rain (Heart Infusion) อย่างละเพลต วางวุ้นที่เพาะเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่บ่มด้วยอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนลอยเกลี่ยเชื้อเพลตละ 4 ชิ้น โดยเป็นเชื้อคนละตัว บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจดูการสร้างโซนใสและบันทึกผล

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และนำไปวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนจากการทดลองซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

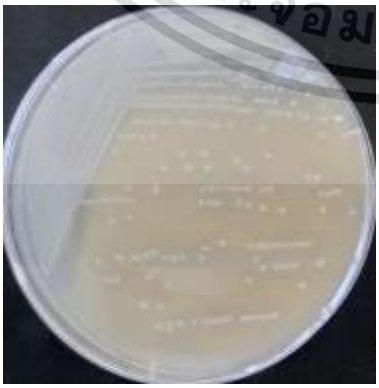
บทที่ 4
ผลและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและทำให้เชื้อบริสุทธิ์

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักถั่วเน่าที่ทำจากถั่วเหลืองและอาหารหมักถั่วเน่าที่ทำจากถั่วมาแฮะ บ่มที่ 30 องศาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าจากอาหารหมักถั่วเน่าที่ทำจากถั่วเหลืองมีทั้งหมด 20 ไอโซเลต และจากตัวอย่างถั่วเน่าที่ทำจากถั่วมาแฮะมีทั้งหมด 13 ไอโซเลต รวมทั้งหมด 33 ไอโซเลต ที่น่าจะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก โดยสังเกตโซนใสรอบๆโคโลนีบนอาหาร MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ (Indriana และคณะ (2563) การเติม $CaCO_3$ ในอาหาร MRS คือการคัดแยกแบคทีเรียที่ไม่สร้างกรดแลคติกออกไป ซึ่งระบุได้จากการเกิดโซนใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย $CaCO_3$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำปฏิกิริยากับกรดแลกติกที่สร้างโดยแบคทีเรีย เกิดเป็นแคลเซียมแลคเตตซึ่งละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เกิดเป็นโซนใสรอบๆโคโลนี ดังภาพที่ 4.1

ก.

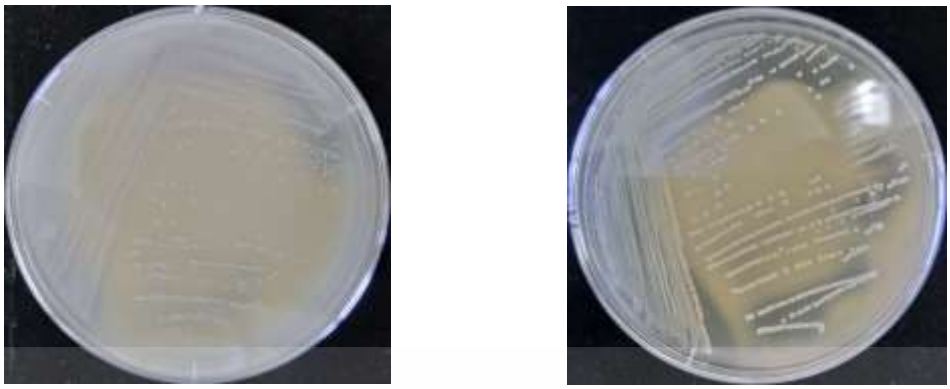
ข.



ค.

ง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



จ. ฉ.

รูปที่ 4.1 ลักษณะเชื้อที่แยกได้จากถั่วเน่า RB1-9 (ก.) RB1-10 (ข.)RB1-13 (ค.) RB2-4 (ง.) RB2-5 (จ.) และ RB2-6 (ฉ.) ที่เจริญบนอาหาร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.1 เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากถั่วเน่าจากการสังเกตโซนใสรอบๆโคโลนีทั้ง พบลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันของเชื้อทั้งหมด 6 แบบ เจริญบนอาหาร MRS ดังนี้ RB1-9 โคโลนีมีลักษณะสีขาวครีม ขอบเรียบ รูปร่างกลม ผิวหน้านูน RB1-10 โคโลนีมีลักษณะใหญ่มีสีขาว ขอบเรียบ รูปร่างค่อนข้างกลม ผิวหน้านูน RB1-13 โคโลนีมีลักษณะสีขาวครีม ขอบเรียบ ผิวหน้านูน RB2-4 โคโลนีมีลักษณะสีเหลืองครีม ขอบเรียบ รูปร่างกลม ผิวหน้านูน RB2-5 โคโลนีมีลักษณะสีขาว ขอบหยัก ผิวหน้าเรียบแบน RB2-6 โคโลนีมีลักษณะสีขาวครีมๆ ขอบเรียบ รูปร่างกลม ผิวหน้านูน

4.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี

4.2.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสพบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดจากทั้งสองตัวอย่างให้ผลการทดสอบเป็นลบ แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 33 ไอโซเลสไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส

4.2.2 การทดสอบการสร้างแก๊สและการเจริญโดยไม่ใช้ออกซิเจน

เมื่อทดสอบการสร้างแก๊สในอาหารพบว่าไอโซเลทที่มีการสร้างแก๊สมี 5 ไอโซเลท ได้แก่ RB1-10, RB1-11, RB1-12, RB1-13 และ RB2-6 และการทดสอบการเจริญโดยไม่ใช้ออกซิเจนโดยการเติม Paraffin oil บนผิวหน้าอาหารเหลว พบว่าไอโซเลตทั้งหมดที่คัดแยกได้จากตัวอย่างทั้งสองสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.

ข.

ค.

ง.

จ.

รูปที่ 4.2 การสร้างแก๊สในหลอดอาหาร และการทดสอบการเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน RB1-10 (ก.) RB1-11 (ข.) RB1-12 (ค.) RB1-13 (ง.) RB2-6 (จ.) ในหลอดอาหาร MRS broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 การย้อมสีแกรม

เมื่อนำเชื้อมาย้อมแกรม แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเชื้อที่คัดแยกมาทั้งหมด 33 ไอโซเลทย้อมติดสีม่วงของ Crystal violet และเมื่อนำมาย้อม Negative stain เพื่อดูรูปร่างการจัดเรียงตัวของเซลล์โดยละเอียด ดังตารางที่ 1 พบการจัดเรียงตัวของเซลล์ได้ 3 แบบ คือ เซลล์รูปร่างกลม จัดเรียงตัวแบบเซลล์เดี่ยว, เซลล์รูปท่อน จัดเรียงตัวแบบเซลล์เดี่ยว และ เซลล์รูปร่างกลม จัดเรียงตัวแบบคู่สี่

รูปที่ 4.3 การติดสีแกรมและการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย 3 ไอโซเลท เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยแต่ละไอโซเลท คือ RB1-9, RB1-8 และ RB2-5

ตารางที่ 4.2 คุณสมบัติของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้

กลุ่ม	รหัส	Gas	สี	ลักษณะโคโลนี	ความโค้งนูน	ขอบ	ความโปร่งใส	Gram	รูปร่างเซลล์
1	RB1-10	+	Creamy-white	Circular	Convex	Entire	Opaque	+	cocci
	RB1-11	+	Creamy-white	Circular	Convex	Entire	Opaque	+	cocci
	RB1-12	+	Creamy-white	Circular	Convex	Entire	Opaque	+	cocci
2	RB1-13	+	Creamy-white	Circular	Convex	Entire	Opaque	+	cocci
3	RB1-1	-	Creamy-white	Circular	Convex	Entier	Opaque	+	cocci
	RB1-2	-	Creamy-white	Circular	Convex	Entire	Opaque	+	cocci
	RB1-4	-	Creamy-white	Circular	Convex	Entire	Opaque	+	cocci
	RB1-5	-	Creamy-white	Circular	Convex	Entire	Opaque	+	cocci
	RB1-7	-	Creamy-white	Circular	Convex	Entire	Opaque	+	cocci
	RB1-16	-	Creamy-white	Circular	Convex	Entire	Opaque	+	cocci

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4	RB1-8	-	Creamy-white	Circular	Convex	Entire	Opaque	+	bacilli
5	RB1-19	-	Creamy-white	Circular	convex	Entire	Opaque	+	Tetrad
6	RB1-3	-	White	Irregular	Flat	Lobate	Opaque	+	Tetrad
	RB1-14	-	White	Irregular	Flat	Lobate	Opaque	+	Tetrad
	RB1-15	-	White	Irregular	Flat	Lobate	Opaque	+	Tetrad
	RB1-17	-	White	Irregular	Flat	Lobate	Opaque	+	Tetrad
	RB1-20	-	White	Irregular	Flat	Lobate	Opaque	+	Tetrad
	RB2-5	-	White	Irregular	Flat	Lobate	Opaque	+	Tetrad
7	RB1-6	-	Creamy-white	Circular	Convex	Entire	Opaque	+	cocci
	RB1-9	-	Creamy-white	Circular	Convex	Entire	Opaque	+	cocci
8	RB2-6	+	Creamy-yellow	Circular	Convex	Undulate	Opaque	+	cocci
9	RB2-1	-	Creamy-yellow	Circular	Convex	Undulate	Opaque	+	bacilli
	RB2-2	-	Creamy-yellow	Circular	Convex	Undulate	Opaque	+	bacilli
	RB2-3	-	Creamy-yellow	Circular	Convex	Undulate	Opaque	+	bacilli
	RB2-4	-	Creamy-yellow	Circular	Convex	Undulate	Opaque	+	bacilli
	RB2-8	-	Creamy-yellow	Circular	Convex	Undulate	Opaque	+	bacilli
	RB2-10	-	Creamy-yellow	Circular	Convex	Undulate	Opaque	+	bacilli
	RB2-11	-	Creamy-yellow	Circular	Convex	Undulate	Opaque	+	bacilli
	RB2-7	-	Creamy-yellow	Circular	Convex	Entire	Opaque	+	bacilli

จากตารางที่ 4.2 จากการทดสอบคุณสมบัติและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลคติก สามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 10 กลุ่ม ที่แตกต่างกัน และคาดว่าแบคทีเรียกลุ่มที่ 5และ6 จากรูปร่างเซลล์รูปร่างกลม จัดเรียงตัวแบบ คู่สี่ เป็นแบคทีเรียกรดแลคติก *Pediococcus* และทำการคัดเลือกไอโซเลทของแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 1 ไอโซเลท เพื่อนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค

4.3 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus*

ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปาก *Streptococcus mutans และ Streptococcus sobrinus* เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อก่อโรค โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone และคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปาก 2 ไอโซเลท จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ได้แก่ RB2-6 และ RB2-13 ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ในขณะที่ไอโซเลท RB1-5 และ RB1-8 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ

S. sobrinus ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* ได้ RB1-13 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. sobrinus* ได้ RB1-19 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* ได้ดีกว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. sobrinus* RB2-4 มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ใกล้เคียงกัน RB1-9 และ RB2-5 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อใดได้เลย ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบ การออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในช่องปาก โดยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลคติกได้

ไอโซเลท	*S. mutans*			*S. sobrinus*		
	Ø Clear zone (ม.ม.)	S.D.	S^2	Ø Clear zone (ม.ม.)	S.D.	S^2
RB1-5	0	0	0	3.5	0.71	0.5
RB1-8	0	0	0	5	0	0
RB1-9	0	0	0	0	0	0
RB1-10	0	0	0	0	0	0
RB1-13	6.5	0.71	0.5	0	0	0
RB1-19	5.5	0.71	0.5	3.5	0.71	0.5
RB2-4	5.5	0.71	0.5	6.75	1.06	1.13
RB2-5	0	0	0	0	0	0
RB2-6	8.5	2.12	4.5	4	0	0
RB2-13	6.5	0.71	0.5	4.75	0.35	0.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.3 จากการทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคที่เรียก่อโรคในช่องปากของแบคทีเรียแลคติก ทั้ง 10 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง ***S. mutans*** ได้ มี 5 ไอโซเลท ได้แก่ RB1-13, RB1-19 และ RB2-4 สามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง *S. sobrinus* มี 6 ไอโซเลท ได้แก่ RB1-5, RB1-8, RB1-19, RB2-4, RB2-6 และ RB2-13 และไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 2 ชนิด นี้ได้ คือ RB1-19, RB2-4 และ RB2-13 แล้วนำมาวิเคราะห์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ได้ผลดังนี้ ***S. mutans*** ได้แก่ RB1-13 (6.5±0.7), RB1-19 (5.5±0.71), RB2-6 (8.5±2.12) และ RB2-13 (6.5±0.7) *S. sobrinus* ได้แก่ RB1-5 (3.5±0.7), RB1-19 (3.5±0.71), RB2-4 (6.75±1.06) และ RB2-13 (4.5±0.35)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาวิจัยในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกจากตัวอย่างถั่วเน่า ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในช่องปาก *Streptococcus mutans และ Streptococcus sobrinus* ผลการทดลองที่ได้ สามารถคัดแยกแบคทีเรียแกรมบวกและสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจากถั่วเน่า 2 ชนิด ได้ 33 ไอโซเลท จากนั้นจึงทำการจัดกลุ่ม และคัดเลือกจนได้มา 10 ไอโซเลท ได้แก่ จากตัวอย่างถั่วเน่าที่ทำจากถั่วเหลืองทั้งหมด 6 ตัว คือรหัส RB1-5, RB1-8, RB1-9, RB1-13 และ RB1-19 จากตัวอย่างถั่วเน่าที่ทำจากถั่วมาแฮะทั้งหมด 4 ตัว คือรหัส RB2-4, RB2-5, RB2-6 และ RB2-13 พบว่าใน 10 ไอโซเลทนี้มี 5 ไอโซเลทที่สามารถสร้างก๊าซในหลอดดักแก๊สได้ คือ RB1-10, RB1-11, RB1-12, RB1-13 และ RB2-6 และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปาก พบว่า RB2-6 และ RB2-13 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในช่องปากได้ดีที่สุด
ดังนั้นจึงสรุปว่าเชื้อ RB2-6 และ RB2-13 เหมาะสมที่สุด ในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นประโยชน์ในอนาคตต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1.จากการศึกษาในงานวิจัยนี้ค้นพบว่าแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากถั่วเน่ามีความสามารถ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค *Streptococcus mutans และ Streptococcus sobrinus* ที่เป็นสาเหตุของโรคในช่องปาก สามารถนำมาพัฒนาต่อยอดงานวิจัย โดยการศึกษาถึงคุณสมบัติการสร้างสารในการยับยั้งและประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ และวิธีการสกัดสารเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่บริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้เป็นประโยชน์ในการรักษาโรค หรือใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอื่นๆได้

2. ในการพัฒนาและต่อยอดงานวิจัยนี้ควรมีการศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกและมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดี โดยละเอียด เพื่อที่จะสามารถทำความเข้าใจถึงลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ระยะการเจริญและการสร้างสารได้ดีที่สุด เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารในการยับยั้งได้มีประสิทธิภาพสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ ยอดอินทร์. 2560. “การใช้ประโยชน์แบคทีเรียแลคติกในอาหารหมัก” ปกิณกะ. 47(4):77-80.

เกตุการ ดาจันทา, ดรุณี อภิชาติสรางกูร, ศศิธร อินเขียน, และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์. 2554. “ถั่วเน่า-ผลิตภัณฑ์

ถั่วเหลืองหมักพื้นเมืองของประเทศไทย” วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 27(1) : 199- 202.

จรัสลักษณ์ เพชรวัง, ธัญมาส พิณราช และคณะ. 2562. "ฤทธิ์ต้านราของแบคทีเรียแลคติก และการประยุกต์ใช้เพื่อป้องกันการเน่าเสียของเมล็ดข้าว" แก่นเกษตร. 47(1):1646-1647.

นวัฒน์เกตุ สวัสดิวงศ์, ธีระ ชัยธนานันต์, อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก, นฤมล ธนานันต์, และ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม. 2558. “การคัดกรองและลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริก.” มหาวิทยาลัย ธรรมศาสตร์.

นิอร โฉมศรี และไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน. ม.ป.ป. “การผลิตถั่วเน่าจากหัวเชื้อ Bacillus subtilis ในการผลิตเครื่อง แกงอินทรีย์”. [ออนไลน์] แหล่งข้อมูล : https://erp.mju.ac.th/openFile.aspx?id=MTAyNTIw (12 พฤศจิกายน 2565)

ปิติ กาลธิยานันทน์ และอารี ชูวิสิฐกุล. 2550. “ถั่วเน่า....อาหารพื้นเมือง ภูมิปัญญาของคนไทยเมืองเหนือ” วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ 55(173) 1-2.

ม.ป.ป. “ถั่วเน่า (Thua-nao) ประโยชน์ สรรพคุณ และวิธีทำถั่วเน่า”. สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤศจิกายน 2565.

สืบค้นจาก https://puechkaset.com/

เรวัตร พงษ์พิสุทธินันทน์. ม.ป.ป. “ถั่วเน่า-STRI ผลงานเชิงประจักษ์”. สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤศจิกายน 2565.

สืบค้นจาก https://stri.cmu.ac.th/innovation.php?id=5

สาวิตรี ดีอราแม. 2562. “ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก: สมบัติเชิงหน้าที่ของจุลินทรีย์ ตอนที่ 1”. วารสารวิจัยและพัฒนา ผลิตภัณฑ์อาหาร. 49(1) 4-7.

สุรัตน์ วังพิกุล. 2557. “การคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากอาหาร หมักพื้นบ้านไทยประเภทข้าวเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในอาหารหมัก”. [ออนไลน์] แหล่งข้อมูล : https://research.rmutsb.ac.th/fullpaper/2557/2557239875487.pdf (12 พฤศจิกายน 2565)

Ismail, Y. S., C. Yulvizar, and B. Mazhitov. 2018. "Characterization of lactic acid bacteria from local cow s milk

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

kefir." IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Vol. 130. No. 1. IOP Publishing,

Kharnaior, Pynhunlang, and Jyoti Prakash Tamang. 2023. "Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated

from the Spontaneously Fermented Soybean Foods of the Eastern Himalayas." Fermentation 9.5: 461.

Moraes, Paula Mendonça, et al. 2010. "Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential." LWT-Food Science and Technology 43.9: 1320-1324.

Putri, Indriana, Siti Nur Jannah, and Susiana Purwantisari. 2020. "Isolation and characterization of lactic acid

bacteria from Apis mellifera and their potential as antibacterial using in vitro test against growth of Listeria monocytogenes and Escherichia coli." NICHE Journal of Tropical Biology 3.1:26-34.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร De Man Rogosa and Sharpe (MRS)	28.57	g
CaCO3	3.5	g
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml

ชั่งสารผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรตามที่กำหนด แล้วนำไปใส่ในขวดฝาเกลียวปริมาตร 250 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ภายใต้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหาร Brain Heart Infusion (BHI)	14.8	g
Agar	6	g
Distilled water	400	ml

ชั่งสารผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรตามที่กำหนด แล้วนำไปใส่ในขวดฝาเกลียวปริมาตร 250 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ภายใต้ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากถั่วเน่าทั้งหมด 33 ไอโซเลท ลงบนอาหาร MRS agar เต็มสูตร ด้วยการ streak ลงบนเพลต แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเก็บรักษาเชื้อ

ใช้ไมโครปิเปตขนาด 1,000 ไมโครลิตร ปิเปิต MRS+ 20% glycerol ใส่ลงไปในหลอด ependroft sterile ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ลูปเขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวมาลงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลอดที่มีอาหาร MRS+ 20% glycerol โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำไป vortex พันหลอดด้วยเทปใส นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ

วันที่ 30 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาวธัญญรัตน์ สีทองธนะวัฒน์ รหัสประจำตัว 62050604

นางสาวนภัสวรรณ ช่อช้าง รหัสประจำตัว 62050606

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชา ชีววิทยา

ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากถั่วเน่า

ชื่อภาษาอังกฤษ Isolation of Lactic Acid Bacteria from fermented Soybean

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 4.63 %

ลงชื่อ..ธัญญรัตน์ สีทองธนะวัฒน์..... ลงชื่อ..นภัสวรรณ ช่อช้าง.....

(นางสาวธัญญรัตน์ สีทองธนะวัฒน์) (นางสาวนภัสวรรณ ช่อช้าง)

นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.กานต์ วงศาริยะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....

(ผศ.ดร.กานต์ วงศาริยะ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้