การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติกจากกากถั่วเหลืองของกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง

(Screening of lactic acid bacteria from soybean solid waste of soymilk processing)

นางสาวปรนีย์ ศรีพินิจ **รหัสประจำตัว 44040757**

นางสาวภัณธิรา เทศฉนอม **รหัสประจำตัว 44040763**

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

พ.ศ.2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20366

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติกจากกากถั่วเหลือง ของกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง

(Screening of Lactic acid bacteria from soybean solid waste of soymilk processing)

จัดทำโดย

นางสาวปรนีย์ ศรีพินิจ รหัสประจำตัว 44040757
นางสาวภัณธิรา เทศถนอม รหัสประจำตัว 44040763

ปค.
ป167ก
2547

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน...96460.....
วัน,เดือน,ปี.....

..... 11 / มิ.ย. / 48

(ผศ.ดร.ศรายุทธ อยู่สง)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรนีย์ ศรีพินิจ และภัณธิรา เทศถนอม. 2548 : การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติกจากกากถั่วเหลืองของกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง (Screening of lactic acid bacteria from soybean solid waste of soymilk processing) ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

บทคัดย่อ

การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากกากถั่วเหลืองอาศัยความสามารถในการกรดและการสร้างสารยับยั้งการเจริญแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารประกอบด้วย *Listeria innocua, Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella* Anatum, *Staphylococcus aureus* และ *Clostridium perfringens* โดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง (agar spot method) ซึ่งสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ดีได้ 4 ไอโซเลท คือ 3 ไอโซเลท (รหัส D12 , D22 , D49) จากบริเวณที่ลึกจากผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลืองประมาณ 6 นิ้ว และ 1 ไอโซเลท (รหัส N11) จากตัวอย่างใหม่ (ที่ได้จากการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง) เมื่อนำมาทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตของน้ำตาล 49 ชนิด พบว่าทั้ง 4 ไอโซเลท คือ *Lactobacillus plantarum*

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอาหารสัตว์จากกากถั่วเหลืองที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง คือ กากถั่วเหลืองไม่ผ่านการนึ่งผสมกับกากน้ำตาลในอัตราส่วนตามแต่ละไอโซเลท คือ แบคทีเรียแลกติก รหัส D12 และ D22 ไม่ต้องผสมกากน้ำตาล ส่วนแบคทีเรียแลกติกรหัส D49 และ N11 ผสมในอัตราส่วนร้อยละ 8 และ 6 ตามลำดับ จากนั้นอัดให้มีความสูง 1.5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 35 - 37 °C) เป็นเวลา 2-3 วันซึ่งช่วงเวลาดังกล่าวแบคทีเรียแลกติกมีกิจกรรมการเจริญสูงคือให้ผลการสร้างกรดที่ดี แต่ถ้าหมักเกิน 3-4 วันแบคทีเรียแลกติกมีกิจกรรมการเจริญลดลง ประสิทธิภาพในการสร้างกรดลดลงตามไปด้วย

ปรนีย์ ศรีพินิจ

ลายมือชื่อนักศึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

11 มี.ค. 48

วัน/เดือน/ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจาก รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง ที่ให้ความเอาใจใส่ตลอดจนแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องรายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้ จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์ และอาจารย์สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา ที่ให้ความกรุณาเป็นคณะกรรมการปัญหาพิเศษ เพื่อความสมบูรณ์ของปัญหาพิเศษ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือทุกด้านเกี่ยวกับการทดลองมาโดยตลอด ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือต่าง ๆ สุดท้ายขอขอบคุณคุณพ่อ คุณแม่ น้อง และเพื่อน ๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือ คอยผลักดันและเป็นกำลังใจอย่างดีเสมอมา

ปรนีย์ ศรีพินิจ

ภัณธิรา เทศถนอม

7 เมษายน 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	I
กิตติกรรมประกาศ	II
สารบัญ	III
สารบัญตาราง	V
สารบัญภาพ	VI
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	
2.1 กากถั่วเหลือง	2
2.2 แบคทีเรียแลกติกและสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น	4
2.3 การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกและการนำไปใช้	7
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	10
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	10
3.3 สารเคมี	10
3.4 สารอาหาร	10
3.5 วิธีการดำเนินการทดลอง	11
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	
4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากกากถั่วเหลือง	
4.1.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกขั้นต้น	15
4.1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกขั้นที่สอง	16
4.1.3 การคัดเลือกขั้นที่สาม : การสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้	18
4.1.4 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีประสิทธิภาพในการหมักกากถั่วเหลือง	22
4.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกในกากถั่วเหลือง	
4.2.1 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกในกากถั่วเหลืองขั้นพื้นฐาน	22
4.2.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกในกากถั่วเหลืองระดับสกุล	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 ศึกษา % moisture และระดับความสูงของกากถั่วเหลืองที่เหมาะสม
ต่อการผลิตอาหารสัตว์จากกากถั่วเหลือง 24

4.4 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตอาหารสัตว์จากกากถั่วเหลือง 25

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 26

เอกสารอ้างอิง 27

ภาคผนวก

ก. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 31

ข. การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์และทางเคมี 33

ค. ข้อมูลผลการทดลอง 38

ง. ภาพผลการทดลอง 48

ประวัติผู้เขียน 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	คุณค่าโภชนาการของกากถั่วเหลือง 100 กรัม	3
2.	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างกรดที่ตรวจนับจากตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่เก็บมาในสภาพต่าง ๆ กัน	15
3.	ผลของการสร้างวงใส (Clear zone) ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนที่ 1 จำนวน 128 เชื้อ บนอาหาร MRS agar (ที่เติม Calcium carbonate 0.5 %) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	16
4.	สรุปจำนวนและรหัสของแบคทีเรียแลกติกที่ผ่านการยืนยันการสร้างกรดจากการคัดเลือกขั้นที่สอง	18
5.	ผลการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกจากขั้นตอนที่สอง	19
6.	ผลการวิเคราะห์แบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากกากถั่วเหลือง	23
7.	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารโดยประมาณ (proximate analysis) ที่ได้หลังจากการหมักเป็นเวลา 5 วัน	25
8.	ผลการวัดขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อ ***Listeria innocua*** โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกากถั่วเหลือง โดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง	38
9.	ผลการวัดขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อ ***Bacillus cereus*** โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกากถั่วเหลือง โดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง	39
10.	ผลการวัดขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อ ***Escherichia coli*** โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกากถั่วเหลือง โดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง	40
11.	ผลการวัดขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อ ***Salmonella anatum*** โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกากถั่วเหลือง โดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง	41
12.	ผลการวัดขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อ ***Clostridium perfringen*** โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกากถั่วเหลือง โดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง	42
13.	ผลการวัดขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อ ***Staphylococcus aureus*** โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกากถั่วเหลือง โดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง	43
14.	ผลการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีประสิทธิภาพในการหมักกากถั่วเหลือง	44
15.	ผลการหมักเพื่อหาปริมาณความชื้นและระดับความสูงที่เหมาะสมของกากถั่วเหลืองที่ใช้หมัก โดยใช้กากถั่วเหลือง 100 กรัม	45
16.	ผลการหมักเพื่อหาปริมาณความชื้นและระดับความสูงที่เหมาะสมของกากถั่วเหลืองที่ใช้หมัก โดยใช้กากถั่วเหลือง 200 กรัม	46
17.	ผลการหมักหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตอาหารสัตว์จากกากถั่วเหลือง	47

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สภาวะการเจริญของแบคทีเรียแลกติกภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย (microaerophilic) จนถึงสภาวะไม่มีอากาศ (strictly anaerobic)	4
2	วิถี homofermentative และ heterofermentation ของแบคทีเรียแลกติก	5
3	กลไกการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยแบคทีเรียแลกติก	6
4	ขั้นตอนการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากกากถั่วเหลืองขั้นที่สอง (Secondary Screening)	12
5	ตัวอย่างของการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคด้วยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	20
6	ตัวอย่างของการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคด้วยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacteriocin – Screening Medium (BSM) agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	21
7	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเพื่อสร้างกรดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ จากกากถั่วเหลืองเมื่อทำการหมักเป็นเวลา 3 วัน	22
8	ตัวอย่างลักษณะทางสรีรวิทยา (ย้อมแกรม) ของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ (ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า)	23
9	การหมักกากถั่วเหลืองปริมาณต่าง ๆ กัน	24
10	ปริมาณความชื้นของกากถั่วเหลืองเท่ากับ 100 และ 200 กรัม โดยมีการปรับความชื้นร้อยละต่าง ๆ	24
11	ผลการหมักกากถั่วเหลืองเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตอาหารสัตว์ของเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 4 ไอโซเลท	25
12	ผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียแลกติกหัส D 12 และ D 22 อาศัยการหมักน้ำตาลจำนวน 49 ชนิด ตาม API 50CH system บริษัท bioMérieux	48
13	ผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียแลกติกหัส D 49 และ N 11 อาศัยการหมักน้ำตาลจำนวน 49 ชนิด ตาม API 50CH system บริษัท bioMérieux	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

กากถั่วเหลืองเป็นของเหลือใช้จากกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงนิยมนำมาเป็นแหล่งโปรตีนในการผลิตอาหารสัตว์แทนปลาป่นที่มีราคาแพง กากถั่วเหลืองที่จะนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ต้องผ่านกระบวนการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียแลกติกที่มีอยู่แล้วในกากถั่วเหลือง ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติก และเอนไซม์ต่าง ๆ เพื่อช่วยในการย่อยสลายสารประกอบที่มีอยู่ในกากถั่วเหลืองให้มีขนาดเล็กลงและสัตว์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น นอกจากนั้นแบคทีเรียแลกติกยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารในสัตว์และมนุษย์ได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกแบคทีเรียแลกติกจากกากถั่วเหลืองที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากกากถั่วเหลือง
2. เพื่อนำกากถั่วเหลืองซึ่งเป็นของเหลือใช้จากการผลิตนมถั่วเหลืองมาเพิ่มมูลค่าโดยนำมาผลิตเป็นอาหารสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 กากถั่วเหลือง

ในกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองทั้งแบบธรรมดาและแบบนมเปรี้ยวพร้อมดื่มจากถั่วเหลือง (กาญจนา และ วราวุฒิ ,2538) ไม่ว่าจะใช้วิธีการผลิตโดยวิธีใดจะมีกากถั่วเหลืองเป็นผลพลอยได้เสมอ ซึ่งตามปกติแล้วกากถั่วเหลืองนี้จะถูกทิ้งไปซึ่งถ้าระบบการกำจัดไม่ดีพอจะก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสุขลักษณะของโรงงานตามมาทันที เช่นก่อให้เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ เป็นแหล่งของแมลงวันและเชื้อโรคต่าง ๆ เป็นต้น ในขณะที่ส่วนอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ถือว่ากากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญที่สุดในโลก ปัจจุบันความต้องการกากถั่วเหลืองเพื่อเป็นแหล่งโปรตีนในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ของประเทศไทยตกปีละประมาณ 1.6 ล้านตัน คิดเป็นเมล็ดถั่วเหลืองถึง 2 ล้านตัน แต่ประเทศไทยสามารถผลิตถั่วเหลืองได้เพียงปีละ 5 แสนตัน จึงต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา จีน อาร์เจนตินา และบราซิล ในรูปของกากถั่วเหลืองปีละกว่า 1 ล้านตัน กากถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์หลายชนิดที่สำคัญได้แก่ ไก่กระทง ไก่สายพันธุ์พ่อแม่ ไก่ไข่ สุกร เป็ดเนื้อ เป็ดไข่ วัว กุ้งและปลา โดยใช้กากถั่วเหลือง 5 – 20 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ส่วนประกอบที่เหลือได้แก่ ข้าวโพด ปลาป่น และอื่น ๆ และเนื่องจากปลาป่นมีราคาแพง การที่ผู้เลี้ยงสัตว์หรือผู้ผลิตอาหารสัตว์สามารถใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนแทนปลาป่นได้มากเท่าไรยิ่งเป็นการประหยัดต้นทุน (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2542)

ในปัจจุบันได้มีการทำวิจัยเพื่อนำกากถั่วเหลืองไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ เช่น Yukie (2000 ; US Patent No. JP 2000102363) อาหารเพื่อสุขภาพที่มีส่วนประกอบหลักคือกากถั่วเหลือง โดยการนำกากถั่วเหลืองใส่ในหม้อที่มีความดันไอน้ำและเติม alkali ion ต้มจนเดือดจากนั้นมาทำให้เย็น เติมน้ำตาล และนำเข้าเครื่องผสม และเติมไดโตซาน แล้วจึงทำการผสมต่อ จากนั้นทำให้เย็น เติมโยเกิร์ตและครีมสด ผสมให้เข้ากันและถ่ายใส่ภาชนะ นำไปบ่ม เมื่อได้ที่นำไปเก็บในตู้เย็น Mariko (1988 ; US Patent No. JP63074474) การทำชากากถั่วเหลือง นำกากถั่วเหลืองมาทำแห้งที่ 40 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 ชั่วโมง และอบที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส นาน 20-30 นาที เพื่อนำมาทำเป็นชากากถั่วเหลือง Kimio (2003 ; US Patent No. JP2003125839) นำกากถั่วเหลืองใส่ในถุงที่น้ำสามารถซึมผ่านได้เพื่อใช้ขัดตัวแทนฟองน้ำ Khachatrjan และ Khachatrjan (2001 ; US Patent No. RU2171293) วิธีการผลิตวอดก้าจากกากถั่วเหลือง นำกากถั่วเหลืองมาใช้แทนแป้งซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตวอดก้าและ Ueda และคณะ (1997 ; US Patent No. JP9132895) การผลิตกระดาษจากกากถั่วเหลืองโดยนำกากถั่วเหลืองไปผลิตเป็นกระดาษโดยโปรตีนในกากถั่วเหลืองจะช่วยให้เยื่อกระดาษมีความแข็งแรงมากขึ้น

ในขณะเดียวกันกากถั่วเหลืองนี้อาจนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยผ่านกระบวนการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในกากถั่วเหลืองที่สามารถผลิตกรดแลคติกและเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีคุณภาพ เพื่อช่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการย่อยสลายสารประกอบต่าง ๆ ที่มีอยู่ในกากถั่วเหลืองให้มีขนาดที่เล็กลงและสัตว์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น (Arimoto ,1962)

การหมักอาหารสัตว์โดยใช้กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบต้องมีการตรวจหา Urease Activity ในกากถั่วเหลือง ซึ่งการพบ Urease residue จะเป็นตัวบ่งชี้ว่าต้องพบสารพวก Trypsin Inhibitor ด้วย เพราะสารสองตัวนี้มีคุณสมบัติเหมือนกันในการทนความร้อน ซึ่งจะพบมากในกากถั่วเหลืองที่ไม่สุก แต่กากถั่วเหลืองที่ได้จากการผลิตนมถั่วเหลืองจากกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองได้ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสอย่างสม่ำเสมอ ถั่วจึงสุกโดยทั่วกัน ทำให้ไม่พบ Urease residue (แพรวาและคณะ, 2527) สำหรับคุณค่าทางโภชนาการของกากถั่วเหลืองแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณค่าโภชนาการของกากถั่วเหลือง 100 กรัม

กากนมถั่วเหลือง		
สารอาหารในวัตถุดิบ	จำนวน	หน่วย
น้ำหนักแห้ง	0.00	%
พลังงานใช้ได้ในสุกร	3,540.00	KgCal/Kg
พลังงานใช้ได้ในสัตว์ปีก	3,540.00	KgCal/Kg
พลังงานใช้ได้ในโค	3,540.00	KgCal/Kg
โปรตีน	31.27	%
ไขมัน	16.22	%
เยื่อใย	22.70	%
แคลเซียม	1.22	%
ฟอสฟอรัส	0.48	%

ที่มา : กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์

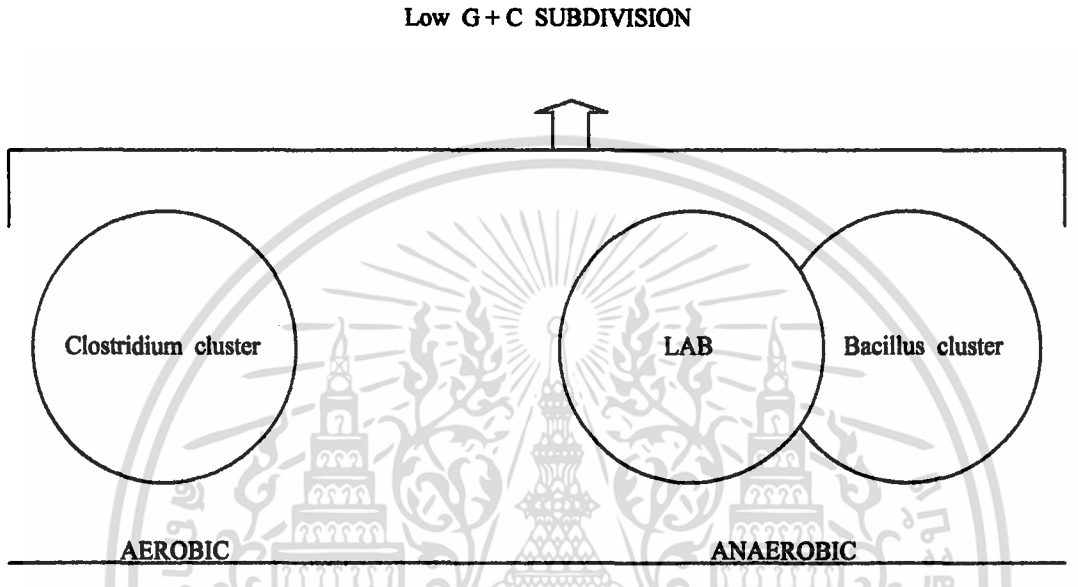
Available at http://mixfeed.webhostme.com/WebMixFeed/GenTableMatt.asp?ID=049. 23 กุมภาพันธ์ 2547

2.2 แบคทีเรียแลกติกและสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น

2.2.1 แบคทีเรียแลกติก (Lactic Acid Bacteria : LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) ที่เจริญเติบโตภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย (microaerophilic) จนถึงสภาวะไม่มีอากาศ (strictly anaerobic) ทั้งนี้แสดงในภาพที่ 1 ไม่สร้างสปอร์ (non-sporulating) สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตได้เป็นผลิตภัณฑ์พวกแลกเตต (lactate) แบคทีเรียแลกติกที่มีรูปร่างกลม ได้แก่ *Lactococcus, Vagococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Aerococcus, Tetragenococcus, Streptococcus* และ *Enterococcus* ส่วนแบคทีเรียแลกติกที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปร่างเป็นท่อน ได้แก่ *Lactobacillus, Carnobacterium* และ *Bifidobacterium* (Pongsak and Parichat, 2000) นอกจากนั้นแบคทีเรียแลกติกยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักได้แก่ homofermentative ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติกด้วยวิถีไกลโคไลติก (glycolytic pathway) และ heterofermentative ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติก เอธานอล กรดอะซีติก และคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยวิถีฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase pathway) ทั้งนี้ดังแสดงในภาพที่ 2



Schematic representation of the phylogenetic position of lactic acid bacteria in relation to anaerobic and aerobic genera of the low G+C subdivision of G^+ bacteria

ภาพที่ 1 สภาวะการเจริญของแบคทีเรียแลกติกภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย (microaerophilic) จนถึงสภาวะไม่มีอากาศ (strictly anaerobic)

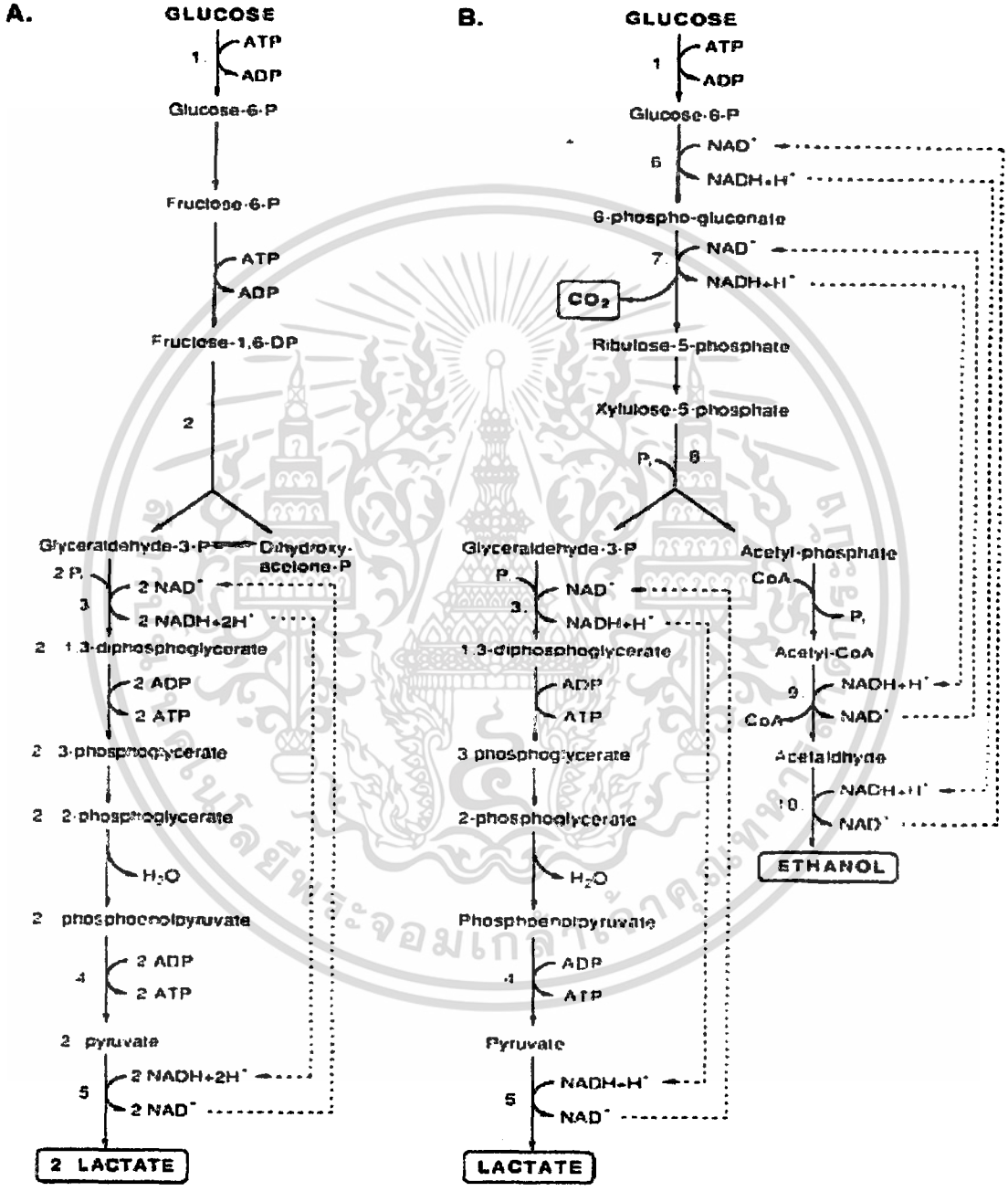
ที่มา : Salminen และ Von Wright (1993)

2.2.2 สารยับยั้งที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น แบคทีเรียแลกติกเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดกลิ่นและรสชาติที่ดีในผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลายชนิด เช่น ไส้กรอก ผลิตภัณฑ์นมหมัก เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกยังมีผลต่ออายุการเก็บรักษาอาหารด้วยเนื่องจากสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (antimicrobials) สารดังกล่าวได้แก่

2.2.2.1 กรดอินทรีย์ (organic acid) กรดอินทรีย์ที่ Lactic Acid Bacteria สร้างขึ้นที่สำคัญ ได้แก่ กรดแลกติก (lactic acid) กรดอะซีติก (acetic acid) จากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต 2 ชนิดมีผลทำให้ค่าพีเอชของอาหารเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญและให้การยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ๆ ด้วย โดยกรดอินทรีย์ดังกล่าวจะมีผลต่อเซลล์เมมเบรนทำให้ electrochemical potential เป็นกลาง กรดอะซีติกทำให้โปรตีนในเซลล์เสียสภาพธรรมชาติ และทำให้ค่าพีเอชภายในเซลล์ (intracellular pH) ของ *Clostridium acetobutylicum* ลดลง นอกจากนี้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Corsetti และคณะ,1998) พบว่า *Lactobacillus sanfrancisco* CB1 สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (antimould compounds) ซึ่งเป็นส่วนผสมของกรดอินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ กรดอะซีติก กรดคาโพรอิก กรดฟอร์มิก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และกรดเอ็นวาเลอริก (n-valeric) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย เช่น *Fusarium, Penicillium, Aspergillus* และ *Monilia* ในการผลิต Sourdough fermentation ได้

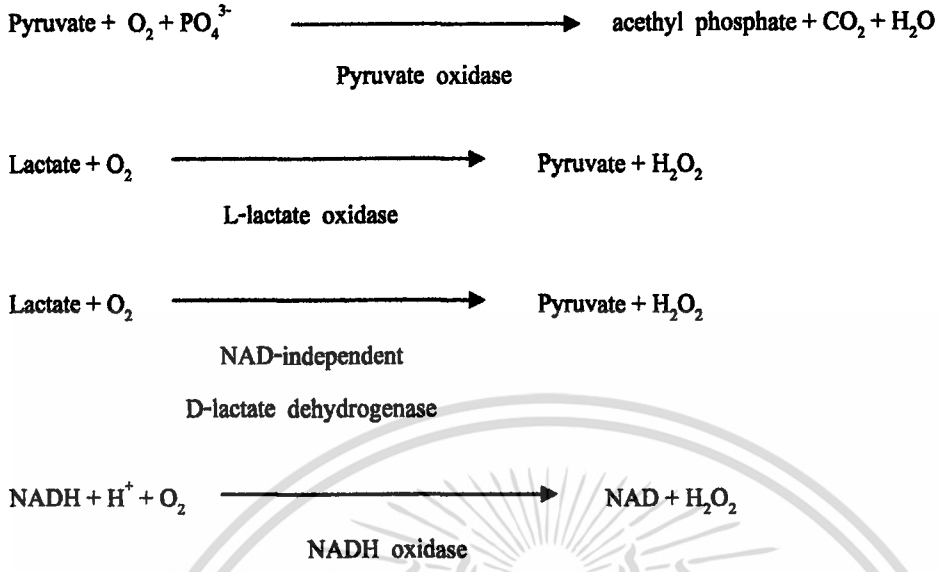


ภาพที่ 2 วิถี homofermentative และ heterofermentation ของแบคทีเรียแลกติก

ที่มา : Salminen และ Von Wright , A. (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) Lactobacilli สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ในระหว่างการเจริญเติบโตโดยมีการสร้างที่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กลไกการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยแบคทีเรียแลกติก
ที่มา : Mark (1989)

แบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus* สามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ เนื่องจากไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่น เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas* spp. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำหน้าที่เป็น precursor ทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่นและเกิดเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น ในน้ำนมดิบ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกจะทำปฏิกิริยากับ endogenous thiocyanate และถูกเร่งปฏิกิริยาด้วย lactoperoxidase เกิดการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ กระบวนการนี้เรียกว่า lactoperoxidase antibacterial system ซึ่งเป็นการยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบที่ไม่ได้แช่เย็น (Mark, 1989)

2.2.2.3. ไดอะเซทิล (diacetyl ; 2,3-butanedione; dimethyl diketone; 2,3 diketobutane) เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในกระบวนการสังเคราะห์ pyruvate ของแบคทีเรียแลกติก สายพันธุ์ที่สามารถสร้างไดอะเซทิล ได้แก่ *Lactococcus, Leuconostoc, Streptococcus, Pediococcus* และ *Lactobacillus* ซึ่งไดอะเซทิลนั้นเป็นที่ทราบกันอย่างดีว่าก่อให้เกิดกลิ่น buttery ในผลิตภัณฑ์นมหมัก (Mark, 1989) แต่ไดอะเซทิลยังก่อให้เกิดผลการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ๆ ด้วย (Jay, 1982) พบว่าปริมาณไดอะเซทิล 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบ และปริมาณ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่กลุ่มของแบคทีเรียแลกติกได้

2.2.2.4. แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) แบคทีเรียแลกติกจะผลิต ribosomally synthesized antimicrobial peptides เรียกว่า แบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็น bioactive peptides หรือ โปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิดได้ ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเน่าเสีย (spoilage microorganisms) และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (food borne pathogens) เช่น *B. cereus, Cl. Botulinum, Staph. aureus, Listeria monocytogenes* (Lejeune และคณะ, 1998) , *A. hydrophila* และ *Micrococcus luteus* (Halami และคณะ, 2000) กลุ่มของแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินนั้นส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ *Carnobacterium, Enterococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus* และ *Weissella* (Halami และคณะ, 2000)

Klaenhammer (1993) แบ่งแบคเทอริโอซินออกเป็น 4 ชนิด ตามลักษณะโครงสร้าง ได้แก่ classes I II III และ IV โดยที่ classes I และ II ส่วนใหญ่จะมีขนาดโมเลกุลเล็กและเป็นเปปไทด์แบบ hydrophobic จึงทนต่อความร้อน classes I เรียกว่า lantibiotic (เช่น ไนซิน) และ classes II เรียกว่า non-lantibiotic ซึ่งแบ่งเป็น 3 ส่วนย่อย คือ classes IIa เป็น pediocin-like bacteriocins ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Listeria* ได้ดีมาก (เช่น leucocin A-UAL 187, curvacin A และ pediocin PA-1) classes IIb เป็นแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วย 2 เปปไทด์ (เช่น lactococcin G และ lactacin F) และ classes IIc เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย sec-dependent mechanism (เช่น lactococcin B) ส่วน classes III เป็นแบคเทอริโอซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและไม่ทนต่อความร้อน (เช่น helveticin J,lactacins A และ B) และสุดท้ายคือ classes IV เป็นแบคเทอริโอซินเชิงซ้อน (complex bacteriocins) ประกอบด้วยส่วนของโปรตีนรวมกับส่วนที่ไม่ใช่โปรตีน ได้แก่ ไขมันหรือคาร์โบไฮเดรต (เช่น plantaricin S, latocin 27 และ leuconocin S) (Verna และคณะ, 1997)

แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกกำลังเป็นที่ได้รับความสนใจในอุตสาหกรรมนมและกำลังมีการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์นม โดยอยู่บนฐานของผลของการยับยั้งจุลินทรีย์ (antagonistic effects) ที่เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย โดยทั่วไปแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกที่มีการศึกษาคุณสมบัติแล้วที่สำคัญได้แก่ nisin , diplococcin , acidophilin , bulgarican , lactacins และ plantaricins (Balasubramanyam and Varadaraj , 1998) สำหรับไนซินนั้นเป็นแบคเทอริโอซินที่นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายและได้รับการยอมรับจาก FDA ตั้งแต่ ค.ศ. 1988 โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Nisaplin (Aplinand Barett Ltd, Trowbridge, UK) ไนซินสร้างขึ้นโดย *Lactococcus lactis* มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ (Delves-Broughton, 1990)

2.3 การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกและการนำไปใช้

การศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคโดยการใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่นนั้นมีหลักฐานว่าเกิดขึ้นก่อนที่จะสิ้นสุดศตวรรษที่ 19 มีรายงานเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตทางชีวภาพ (biocontrol agent) ในอาหาร จากงานวิจัยของ Saleh and Ordal (1955) ที่ทดลองถ่ายเชื้อ *L. lactis* ในไก่แช่แข็งที่มีการเจริญและผลิตสารพิษของ *C. botulinum* ต่อมา Gilliland and Speck (1975) และ Raccach *et al.* (1979) ได้นำแบคทีเรียแลกติกจำนวนมาก (10^8 cfu / ml หรือมากกว่า) ถ่ายเชื้อลงบนเนื้อเพื่อเพิ่มอายุการเก็บและป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค โดยรายงานผลว่าปริมาณเกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพียงเล็กน้อยหรือไม่มีกรดนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเจริญเติบโตของเชื้อ การเน่าเสียที่เกิดขึ้นช้าระหว่างการเก็บรักษาหรืออุณหภูมิที่เปลี่ยนไปจะก่อให้เกิดการผลิตสารที่ก่อให้เกิดการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน นอกจากนี้แล้วยังมีการใช้แบคทีเรียแลกติกในผลิตภัณฑ์จำพวกผัก Romick (1994) ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ *L. plantarum* เป็นสายพันธุ์ที่ป้องกันการเจริญเติบโตของ *Lis. monocytogens* ในผลิตภัณฑ์แตงกวาดองในน้ำเกลือ ผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีการผลิตกรด (nonacidified) และไม่มีการแช่เย็น พบว่าแตงกวามีลักษณะปรากฏที่ยังมีความสดและมีเนื้อสัมผัสที่ดี *Lis. Monocytogens* ที่เป็นเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้มีคุณสมบัติทางพันธุกรรมว่าเป็นสายพันธุ์ที่สามารถเจริญในน้ำเกลือของแตงกวาดองที่ 5 องศาเซลเซียส (เพิ่มขึ้น 1-2 log unit ใน 20 วัน) และในอุณหภูมิสูงกว่าได้ (ประมาณ 20 องศาเซลเซียส) อย่างไรก็ตามพบว่าการเจริญของ *Lis. Monocytogens* ถูกจำกัดโดยการเจริญอย่างเป็นธรรมชาติของแบคทีเรียแลกติก คือ *L.plantarum* Vescovo *et al.* (1996) คัดแยกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกที่อยู่ในกลุ่มที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (psychrotrophic) จากผักสดที่เป็นส่วนผสมในสลัดและคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซินหรือเกิดวงใสการยับยั้ง (clear zone) จากการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเมื่อใช้ agar diffusion tests เมื่อคัดเลือกได้แล้วนำไปทดสอบในผลิตภัณฑ์สลัดที่มี *Aeromonas hydrophilla, Lis. Monocytogens, Staph. Typhimurium* และ *Staph. Aureus* (ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^5 cfu / g) พบว่าจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคดังกล่าวไม่สามารถตรวจพบในวันที่ 6 ของการเก็บรักษา (Fred and Henry, 1997) นอกจากนี้ยังมีการแยกแบคทีเรียแลกติกจากแหล่งต่าง ๆ กัน เพื่อให้ได้มาซึ่งแบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้าง แบคเทอริโอซินใหม่ ๆ และนำมาใช้ประโยชน์แก่อุตสาหกรรมอาหาร ดังต่อไปนี้

Kelly *et al.* (1996) คัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารสำเร็จรูป พบสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจำนวน 22 สายพันธุ์จากตัวอย่างอาหาร 14 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 41 ตัวอย่าง พบว่าสายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ ปลา และผลิตภัณฑ์จากนมและเป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus* และ *Lactococcus* แต่สายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารจำพวกผลิตภัณฑ์จากผักและผลไม้เป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่ม *Lactococcus* ดังนั้นอาหารที่พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจะก่อให้เกิดความปลอดภัยต่ออาหารนั้นและยังเป็นการถนอมรักษาอาหารโดยวิธีทางชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปน้อย (minimally processed products)

Reenen *et al.* (1998) คัดแยก *L plantarum* 423 จาก sorghum beer ซึ่งผลิตแบคเทอริโอซิน คือ plantaricin 423 ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ *B. cereus, C. sporogenes, En. faecalis, Listeria* spp. และ *Staphylococcus* spp. โดยที่ plantaricin 423 สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงที่ 80 องศาเซลเซียส แต่กิจกรรมของ plantaricins 423 จะลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาทีและลดลง 75 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการฆ่าเชื้อ (121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Miteva *et al.* (1998) ศึกษาสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *L. delbrueckii* ที่แยกได้จาก Bulgarian yellow cheese ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้ง *Lis. monocytogens, Staph. aureus,En. faecalis, E. coli, Yersinia enterocolitica* และ *Y. pseudotuberculosis* ได้

Balasubramangam and Varadaraj (1998) คัดแยก *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* CFR 2028 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้กันมากในอาหารหมักของประเทศอินเดีย พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. cereus* F4810 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ milk medium ให้ผลการยับยั้งสูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และมีการสร้างสารยับยั้งในช่วง logarithmic และช่วงปลาย stationary ของการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังพบว่าสารยับยั้งดังกล่าวมีความคงตัวในสภาวะที่มีค่าพีเอชต่ำ (3.8 – 5.0) และทนต่อความร้อน (75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที)

Bogovic-Matijasic *et al.* (1998) พบว่า *L .acidophilus* LF221 สามารถผลิตสารยับยั้งที่มีคุณสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. cereus, Clostidium sp. Lis. innocua, Staph. aureus,* และ *Streptococcus* เมื่อตรวจสอบแล้วพบว่าสารยับยั้งดังกล่าวเป็นแบคเทอริโอซิน คือ acidocin LF221 A และ acidocin LF221 B นอกจากนี้ *L. acidophilus* LF221 ยังได้รับความสนใจเนื่องจากเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์โพรไบโอติก (probiotic strain) อีกด้วย

Ostergaaed *et al.* (1998) คัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้ง *Listeria* sp. (*Lis. innocua*) จากผลิตภัณฑ์ปลาหมักของไทยได้แบคทีเรียแลกติก 4150 โคโลนีโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งให้ผลการยับยั้งทั้งหมด 44 สายพันธุ์ จาก 44 สายพันธุ์พบว่ามี 43 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Lis. monocytogens* แบคทีเรียแลกติกทั้งหมด 44 สายพันธุ์แสดงผลการยับยั้ง *Vibrio cholerae* และ *V. parahaemolyticus* นอกจากนี้พบว่ามี 37 สายพันธุ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้ปลาเน่าเสีย (เช่น *Aeromonas* sp.) ได้ โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส และทนต่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ถึง 6.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะทำให้เกิดความปลอดภัยในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว

วิลาวัณย์ (2543) แยกแบคทีเรียแลกติกได้ 212 ไอโซเลท จากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ 329 ตัวอย่าง พบว่าเป็นแบคทีเรียแลกติกในสกุล *Lactobacillus* 198 ไอโซเลท และ *Pediococcus* 14 ไอโซเลท และเมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ทั้งหมดไปทดสอบผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 4 ชนิด คือ *B. cereus* ATCC 11778, *Staph. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 และ *S. typhimurium* 3230 พบว่าแบคทีเรียแลกติก 193 ไอโซเลท สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 ชนิดได้ แต่เมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธีเดียวกันในสภาพจำกัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์และจำกัดผลการยับยั้งจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์พบว่ามีเพียง 10 ไอโซเลท ที่แสดงผลการยับยั้งและจากการเทียบเคียงชนิดแบคทีเรียแลกติกพบว่าเป็น *L. plantarum* 6 ไอโซเลท *L. brevis* และ *L. fermentum* อย่างละ 2 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือก *L. fermentum* P5 มาศึกษาสมบัติบางประการของสารยับยั้งดังกล่าวพบว่านอกจากกรดอินทรีย์แล้วยังมีสารอื่นที่มีคุณสมบัติเป็นพวกสารโปรตีนที่ทนความร้อนได้สูง และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง ได้แก่ *Listeria innocua* , *Staph. aureus* , *B. cereus* , *E. coli* , *Salmonella* Anatum. และ *Clostidium perfringens* (ศิริมา ,2545)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2.1	เครื่องชั่งแบบหยาบ	PE 204	Mettler	สวิสเซอร์แลนด์
3.2.2	เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง	BP 221S	Sartorious	เยอรมัน
3.2.3	เครื่องเขย่าผสม	G-560E	Vortex	สหรัฐอเมริกา
3.2.4	ตู้บ่มเชื้อ		Memmert	เยอรมัน
3.2.5	หม้อนึ่งความดัน (autoclave)	SS-245	Tomy	ญี่ปุ่น
3.2.6	ตู้ปลอดเชื้อ	ABS 1200A		อังกฤษ
3.2.7	เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)	Universal 16	Hettich	เยอรมัน
3.2.8	กล้องจุลทรรศน์	CH 30	Olympus	ญี่ปุ่น
3.2.9	ชุดสกัดไขมัน Soxhlet		Gerhardt	เยอรมัน
3.2.10	ชุดกลั่นโปรตีน Kjedahl		Gerhardt	เยอรมัน

3.3 สารเคมี

3.3.1	Ammonium citrate	Merck
3.3.2	Magnesium sulfate heptahydrate	Carloerba
3.3.3	Manganese (II) sulfate monohydrate	Merck
3.3.4	Sodium acetate	Merck
3.3.5	di-Potassium hydrogen phosphate-3-hydrate	Merck

3.4 สารอาหาร

3.4.1	Proteose peptone	Oxiod
3.4.2	Meat extract	Merck
3.4.3	Yeast extract	Merck
3.4.4	Dextrose	Merck
3.4.5	Tween 80	Labchem

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากกากถั่วเหลือง

ก. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกขั้นต้น (Primary Screening)

ทำการแยกแบคทีเรียแลกติกจากกากถั่วเหลืองซึ่งเก็บตัวอย่างจาก 3 บริเวณ ประกอบด้วย บริเวณผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลืองในโรงเก็บกากถั่วเหลือง (ซึ่งสัมผัสอากาศ) บริเวณที่ลึกจากผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลืองประมาณ 6 นิ้ว และตัวอย่างใหม่ (ที่ได้จากการผลิตนมถั่วเหลือง)

ขั้นตอนการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากกากถั่วเหลืองทำโดยการเจือจางกากถั่วเหลืองใน 0.1% sterile peptone water โดยเจือจางจนถึง 10^{-5} ก่อนนำตัวอย่างที่เจือจางในแต่ละระดับมาแยกจุลินทรีย์โดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5 % (ภาคผนวก ก) บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างกรดซึ่งสังเกตได้จากที่มีวงใส (Clear zone) อยู่โดยรอบโคโลนี

ข. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกขั้นที่สอง (Secondary Screening)

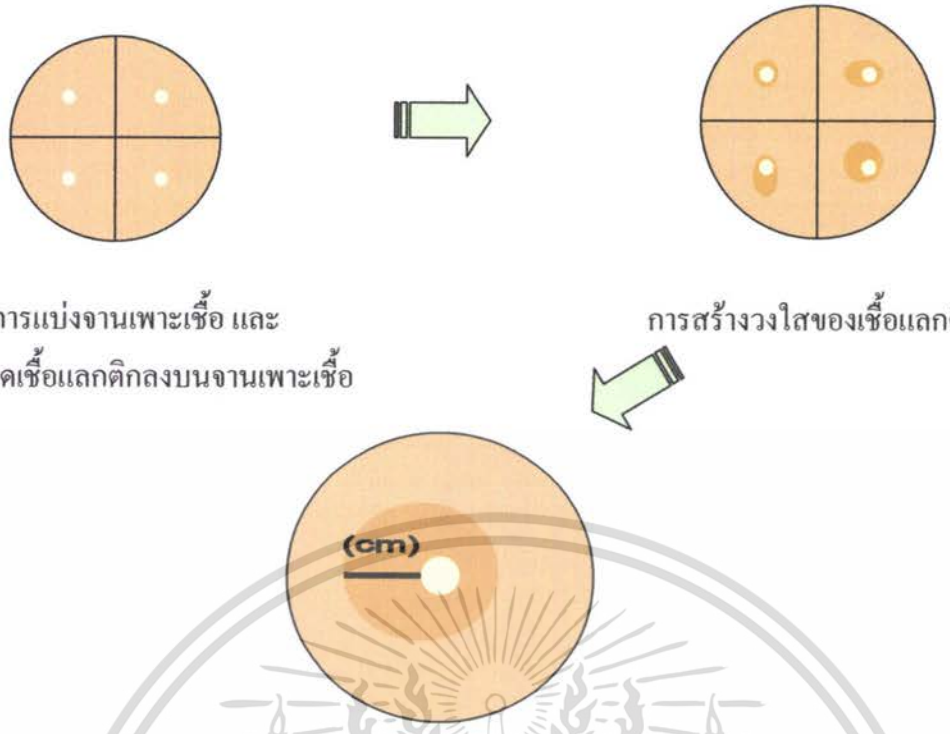
ขั้นตอนนี้เป็นการยืนยันว่าเชื้อที่คัดเลือกจากขั้นตอนที่ 1 สามารถที่จะสร้างกรดได้หรือไม่ โดยอาศัยการทดสอบหาวงใส (Clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (ที่เติม Calcium carbonate 0.5 %)

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากขั้นต้น ซึ่งเก็บไว้เป็น stock culture มาเลี้ยงใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเชื้อปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร หยดลงที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (ที่เติม Calcium carbonate 0.5 %) ซึ่งแบ่งเป็น 4 ส่วนครบทั้ง 4 ส่วน ก่อนที่จะนำไปบ่มใน candle jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4 ทำการบันทึกผลโดยวัดความกว้างของวงใสที่เชื้อแลกติกสร้างขึ้นโดยวัดจากขอบนอกของโคโลนีจนถึงสุดเขตบริเวณวงใสก่อนที่จะคัดเลือกเชื้อแลกติกที่สามารถสร้างวงใสได้กว้างที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาในขั้น Tertiary Screening ต่อไป

ค. การคัดเลือกขั้นที่สาม (Tertiary Screening) : การสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

ในการนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้กลับไปใช้ในการหมักกากถั่วเหลืองเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์นั้น มีความจำเป็นที่จะต้องป้องกันปัญหาที่อาจจะเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในกากถั่วเหลืองหมักนั้น ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้นำแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยืนยันการสร้างกรดทั้ง 18 เชื้อมาศึกษาถึงการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคจากแบคทีเรียแลกติก ทั้งนี้แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วย *Listeria innocua, Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella* Anatum, *Staphylococcus aureus* และ *Clostidium perfringens*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากกากถั่วเหลืองขั้นที่สอง (Secondary Screening)

วิธีการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคบนอาหารแข็งโดยวิธี agar spot method (Spelhaug and Harlander, 1989) ทำการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกที่ต้องการทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้มีจำนวนประมาณ 10^7 cfu ต่อมิลลิลิตร จากนั้นแบ่งการทดสอบเป็น 2 แบบ คือ

การยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคด้วยกรดที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS agar ซึ่งมีการแบ่งจานเพาะเชื้อออกเป็น 4 ส่วน จากนั้นทำการหยดแบคทีเรียแลกติก 0.01 มิลลิลิตร ณ ตำแหน่งที่กำหนดไว้ที่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Yeast Extract (TSAYE) soft agar (ภาคผนวก ก) ที่มีเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค เจริญอยู่ประมาณ 10^5 cfu ต่อมิลลิลิตร บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อีกครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจผลการยับยั้งด้วยการวัดขนาดวงใสการยับยั้ง (Inhibition zone หรือ Clear zone) โดยวัดจากขอบหยดเชื้อแบคทีเรีย แลกติกจนสุดขอบวงใส

การยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคด้วยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Bacteriocin – Screening Medium (BSM) agar (ภาคผนวก ก) ซึ่งมีการแบ่งจานเพาะเชื้อออกเป็น 4 ส่วน จากนั้นทำการหยดสารละลายแบคทีเรียแลกติก 0.01 มิลลิลิตร ณ ตำแหน่งที่กำหนดไว้ที่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เททับด้วย TSAYE soft agar ที่มีเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค เจริญอยู่ประมาณ 10^5 cfu ต่อมิลลิลิตร บ่มใน candle jar อีกครั้งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Swetwiwathana and Lotong, 1999) ทำการตรวจผลการยับยั้งด้วยการวัดขนาดวงใสการยับยั้ง (Inhibition zone หรือ Clear zone) โดยวัดจากขอบหยดเชื้อแบคทีเรีย แลกติกจนสุด ขอบวงใส

ง. ขั้นตอนการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีประสิทธิภาพในการหมักกากถั่วเหลือง

การนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้มาศึกษาประสิทธิภาพการสร้างกรดในการหมักกากถั่วเหลือง โดยการนำหมักกับกากถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ทำการตรวจผลการหมักทุก 24 ชั่วโมงโดยการวัด % acidity ดัดแปลงมาจาก AOAC 2000 (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 3 วัน

ตอนที่ 2 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกในกากถั่วเหลือง

ก. การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกในกากถั่วเหลืองขั้นพื้นฐาน

เลือกโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่แยกเดี่ยวมาศึกษาลักษณะรูปร่าง (morphology) ลักษณะสรีรวิทยา (physiology) และทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) ซึ่งยึดตามแนวทางการจัดจำแนกแบคทีเรียจากหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (Peter et al., 1993)

การทดสอบทางชีวเคมี

การย้อมสีแกรม (Gram stain) ตามวิธีของ Hucker (Doetsch, 1981) เกลี่ย (smear) เชื้อแบคทีเรียบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ นำไปผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง หยดสีแกรมคริสตัลไวโอเล็ต (ภาคผนวก ข) ให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อเป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำ หยดแกรมไอโอดีน (ภาคผนวก) ลงให้ท่วมนาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำ และล้างสีออกด้วย 95% เอทานอล โดยเอียงสไลด์ให้ 95% เอทานอลไหลผ่าน สังเกตดูสีคริสตัลไวโอเล็ตที่ถูกชะออกมา พอเริ่มจาง หยุดปฏิกิริยาโดยจุ่มลงในน้ำ ซับน้ำให้แห้ง ย้อมสีซาฟรานินโอ (ภาคผนวก ข) ลงบนเชื้อนาน 20-30 วินาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง นำไปตรวจลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมัน กำลังขยาย 1000 เท่า

ข. การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกในกากถั่วเหลืองระดับสกุล

นำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้มาทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตจำนวน 49 ชนิด ใช้ API 50CH system บริษัท bioMérieux โดยเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียแลกติกใส่ใน Lactobacillus medium จนกระทั่งได้เชื้อปริมาณ 2 McF. จากนั้นหยดใน API 50CH Medium ปิดทับด้วยน้ำมันพาราฟินเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีแล้วนำไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ APILAB Plus software program

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตอนที่ 3 ศึกษา % ความชื้นและระดับความสูงของกากถั่วเหลืองเหมาะสมต่อการผลิตอาหารสัตว์จากกากถั่วเหลือง

ในการหมักกากถั่วเหลืองเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์นั้นได้พบว่าปัญหาที่เกิดขึ้นคือ กากถั่วเหลืองที่ใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการหมักมีความชื้นน้อยมากทำให้มีสภาพไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติก และพบว่าระดับความสูงของกากถั่วเหลืองที่หมักมีผลต่อการกระจายตัวของออกซิเจนในบริเวณด้านบนของกากถั่วเหลืองจะเป็นการหมักของแบคทีเรียแลกติก ส่วนบริเวณด้านล่างที่ติดกับภาชนะที่ใช้หมักจะเป็นการหมักของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการหมักเพื่อหา % ความชื้น และความสูงของกากถั่วเหลืองที่ใช้หมักเพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติก โดยแบ่งการหมักเป็น 2 แบบ คือ

การหมักโดยใช้กากถั่วเหลือง 100 กรัม ที่ผ่านการนึ่งให้ร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ผสมกับ 5 % เชื้อแลกติก D48 และเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตรต่าง ๆ กันคือ 0 , 5 , 10 , 15 และ 20 มิลลิลิตร ความชื้นทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 4.10 , 8.20 , 12.30 , 16.40 และ 20.50 ตามลำดับ เพื่อเพิ่มระดับความชื้นของกากถั่วเหลือง จากนั้นทำการคลุกเคล้าเชื้อและน้ำให้ทั่ว อัดกากถั่วเหลืองให้มีความสูง 1.5 เซนติเมตรซึ่งวัดจากด้านล่างภาชนะ ทำการตรวจผลการหมักทุก 24 ชั่วโมงโดยการวัด % acidity ดัดแปลงมาจาก AOAC 2000 เป็นเวลา 3 วัน

การหมักโดยใช้กากถั่วเหลือง 200 กรัม ที่ผ่านการนึ่งให้ร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ผสมกับ 5 % เชื้อแลกติก D48 และเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตรต่าง ๆ กันคือ 0 , 5 , 10 , 15 และ 20 มิลลิลิตร ความชื้นทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 8.20 , 12.30 , 16.40 , 20.50 และ 24.60 ตามลำดับ เพื่อเพิ่มระดับความชื้นของกากถั่วเหลือง จากนั้นทำการคลุกเคล้าเชื้อและน้ำให้ทั่ว อัดกากถั่วเหลืองให้มีความสูง 2.5 เซนติเมตรซึ่งวัดจากด้านล่างภาชนะ ทำการตรวจผลการหมักทุก 24 ชั่วโมงโดยการวัด % acidity ดัดแปลงมาจาก AOAC 2000 เป็นเวลา 3 วัน

ตอนที่ 4 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตอาหารสัตว์จากกากถั่วเหลือง

เปรียบเทียบการหมักกากถั่วเหลืองที่ทำการหมักในสภาวะที่เหมาะสม ทำการหมักในระยะเวลา 5 วัน (จรูญรัตน์ , 2529) ศึกษาเปรียบเทียบผลการเจริญของเชื้อแลกติก โดยทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 1 , 3 และ 5 เพื่อติดตามอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลกติกโดยการวัดเพื่อหาปริมาณกรดทั้งหมด และวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารโดยประมาณ (proximate analysis) ดัดแปลงมาจาก AOAC 2000 (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากกากถั่วเหลือง

4.1.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกขั้นต้น

จากการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกขั้นต้นจากกากถั่วเหลือง (ตารางที่ 2) พบว่า ปริมาณของแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างของกากถั่วเหลืองที่เก็บจากผิวหน้าของกระบะรับกากถั่วเหลือง บริเวณที่ลึกจากผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลืองประมาณ 6 นิ้ว และกากถั่วเหลืองสดแตกต่างกัน โดยที่แบคทีเรียแลกติกสามารถตรวจพบได้มากในบริเวณที่ลึกจากผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลืองประมาณ 6 นิ้ว ทั้งนี้เนื่องจากในบริเวณดังกล่าวมีอากาศเพียงเล็กน้อยจึงเหมาะแก่การเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลกติกซึ่งเป็นกลุ่มที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญเติบโต

ตารางที่ 2 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างกรดที่ ตรวจนับจากตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่เก็บมาในสภาพต่าง ๆ กัน

ตำแหน่งเก็บตัวอย่าง	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (cfu/g)	ปริมาณแบคทีเรียที่สร้างกรด (cfu/g)
กากถั่วเหลืองบริเวณผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลือง (สัมผัสกับอากาศ)	5.46	3.9
บริเวณที่ลึกจากผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลืองประมาณ 6 นิ้ว	4.92	4.11
ตัวอย่างใหม่(ที่ได้จากการผลิตนมถั่วเหลือง)	2.87	2.04

ทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียแลกติกและทำให้เป็น Pure culture ก่อนที่จะนำมาเก็บรักษาไว้ใน MRS agar slant เพื่อใช้ในการศึกษาในระดับ Secondary Screening ต่อไป อนึ่งปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกขั้นต้นได้ทั้งหมด 128 เชื้อ โดยแบ่งออกเป็น

- กากถั่วเหลืองบริเวณผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลือง(สัมผัสกับอากาศ) 30 เชื้อ
- บริเวณที่ลึกจากผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลืองประมาณ 6 นิ้ว 87 เชื้อ
- ตัวอย่างใหม่(ที่ได้จากการผลิตนมถั่วเหลือง) 11 เชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกขั้นที่สอง

ผลของคัดเลือกเชื้อแลกติกขั้นที่สองซึ่งอาศัยการยืนยันการสร้างกรดแสดงอยู่ในตารางที่ 3 ซึ่งพบว่า แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกจากกากถั่วเหลืองบริเวณผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลือง (สัมผัสกับอากาศ) รหัส T1 – T30 สามารถยืนยันการสร้างกรดได้ 8 เชื้อ ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกจากกากถั่วเหลืองบริเวณที่ลึกจากผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลืองประมาณ 6 นิ้ว รหัส D1 – D87 สามารถยืนยันการสร้างกรดได้ 43 เชื้อ ส่วนแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกจากกากถั่วเหลืองตัวอย่างใหม่ (ที่ได้จากการผลิตนมถั่วเหลือง) รหัส N1 – N11 สามารถยืนยันการสร้างกรดได้ 6 เชื้อ

ตารางที่ 3 ผลของการสร้างวงใส (Clear zone) ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนที่ 1 จำนวน 128 เชื้อ บนอาหาร MRS agar (ที่เติม Calcium carbonate 0.5 %) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เชื้อ	ความกว้างของวงใส (cm)	เชื้อ	ความกว้างของวงใส (cm)	เชื้อ	ความกว้างของวงใส (cm)	เชื้อ	ความกว้างของวงใส (cm)
T1	(-)	D3	0.55	D35	0.65	D67	0.35
T2	(-)	D4	0.4	D36	(-)	D68	0.6
T3	0.35	D5	(-)	D37	(-)	D69	0.4
T4	0.3	D6	(-)	D38	(-)	D70	(-)
T5	(-)	D7	(-)	D39	(-)	D71	0.5
T6	(-)	D8	0.7	D40	0.6	D72	(-)
T7	(-)	D9	0.4	D41	(-)	D73	0.5
T8	0.5	D10	(-)	D42	0.7	D74	(-)
T9	(-)	D11	(-)	D43	(-)	D75	(-)
T10	(-)	D12	0.7	D44	(-)	D76	0.5
T11	(-)	D13	(-)	D45	(-)	D77	0.7
T12	(-)	D14	(-)	D46	(-)	D78	0.1
T13	(-)	*D15*	*0.6*	D47	(-)	D79	(-)
T14	(-)	D16	0.7	D48	0.75	D80	(-)
T15	0.4	D17	0.75	D49	0.7	D81	(-)
T16	0.4	D18	(-)	D50	(-)	D82	0.6

หมายเหตุ : รหัสของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ ประกอบด้วย T = คัดเลือกจากกากถั่วเหลืองบริเวณผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลือง(สัมผัสกับอากาศ) ; D = คัดเลือกจากกากถั่วเหลืองบริเวณที่ลึกจากผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลืองประมาณ 6 นิ้ว ; N = คัดเลือกจากกากถั่วเหลืองตัวอย่างใหม่(ที่ได้จากการผลิตนมถั่วเหลือง); (-) = ไม่สามารถวัดวงใสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ผลของการสร้างวงใส (Clear zone) ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนที่ 1 จำนวน 128 เชื้อ บนอาหาร MRS agar (ที่เติม Calcium carbonate 0.5 %) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ต่อ)

เชื้อ	ความกว้างของวงใส (cm)	เชื้อ	ความกว้างของวงใส (cm)	เชื้อ	ความกว้างของวงใส (cm)	เชื้อ	ความกว้างของวงใส (cm)
T17	(-)	D19	0.6	D51	(-)	D83	0.5
T18	(-)	D20	(-)	D52	0.7	D84	0.7
T19	0.3	D21	(-)	D53	0.8	D85	(-)
T20	(-)	D22	0.7	D54	(-)	D86	0.65
T21	(-)	D23	0.6	D55	0.2	D87	(-)
T22	(-)	D24	0.6	D56	0.8	N1	(-)
T23	0.5	D25	0.65	D57	0.4	N2	0.4
T24	0.4	D26	0.6	D58	(-)	N3	0.3
T25	(-)	D27	0.65	D59	(-)	N4	(-)
T26	(-)	D28	(-)	D60	(-)	N5	0.7
T27	(-)	D29	(-)	D61	(-)	N6	0.5
T28	(-)	D30	(-)	D62	0.2	N7	(-)
T29	(-)	D31	0.75	D63	(-)	N8	(-)
T30	(-)	D32	(-)	D64	0.4	N9	0.65
D1	(-)	D33	0.7	D65	(-)	N10	(-)
D2	(-)	D34	0.7	D66	0.5	N11	0.7

หมายเหตุ : รหัสของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ ประกอบด้วย T = คัดเลือกจากกากถั่วเหลืองบริเวณผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลือง(สัมผัสกับอากาศ) ; D = คัดเลือกจากกากถั่วเหลืองบริเวณที่ลึกจากผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลืองประมาณ 6 นิ้ว ; N = คัดเลือกจากกากถั่วเหลืองตัวอย่างใหม่(ที่ได้จากการผลิตนมถั่วเหลือง); (-) = ไม่สามารถวัดวงใสได้

จากผลการยืนยันการสร้างกรดของเชื้อที่คัดเลือกได้จำนวน 57 เชื้อจาก 128 เชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 3 นั้น สามารถที่จะแบ่งได้เป็น 7 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
96460

ตารางที่ 4 สรุปจำนวนและรหัสของแบคทีเรียแลกติกที่ผ่านการยืนยันการสร้างกรดจากการคัดเลือกขั้นที่สอง

ความกว้างของวงใส (cm)	จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่ยืนยันการสร้างกรด (เชื้อ)	รหัสเชื้อ
< 0.3	3	D55, D62, D78
0.3 – 0.39	5	T3, T4, T19, D67, N3
0.4 – 0.49	9	T15, T16, T24, D4, D9, D57, D64, D69, N2
0.5 – 0.59	9	T8, T23, D3, D66, D71, D73, D76, D83, N6
0.6 – 0.69	13	D15, D19, D23, D24, D25, D26, D27, D35, D40, D68, D82, D86, N9
0.7 – 0.79	16	D8, D12, D16, D17, D22, D31, D33, D34, D42, D48, D49, D52, D77, D84, N5, N11
≥ 0.8	2	D53, D56

ดังนั้นจากการคัดเลือกในขั้นที่สองนี้สามารถเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ต้องการได้ คือ เชื้อที่สามารถสร้างวงใสได้มากที่สุด (ในช่วง 0.7 – 0.8 cm) จำนวนทั้งสิ้น 18 เชื้อ (ประกอบด้วย เชื้อรหัส D8, D12, D16, D17, D22, D31, D33, D34, D42, D48, D49, D52, D53, D56, D77, D84, N5, N11 ซึ่งจะนำไปทำการทดลองในการคัดเลือกในขั้นที่สาม (Tertiary Screening) ต่อไป

4.1.3 การคัดเลือกขั้นที่สาม : การสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

จากการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกขั้นที่สามโดยพิจารณาจากประสิทธิภาพในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้มีความสามารถในการสร้างกรดและแบคเทอริโอซินที่แตกต่างกันดังตารางที่ 5 และลักษณะการยับยั้งแสดงในภาพที่ 5 และ 6 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

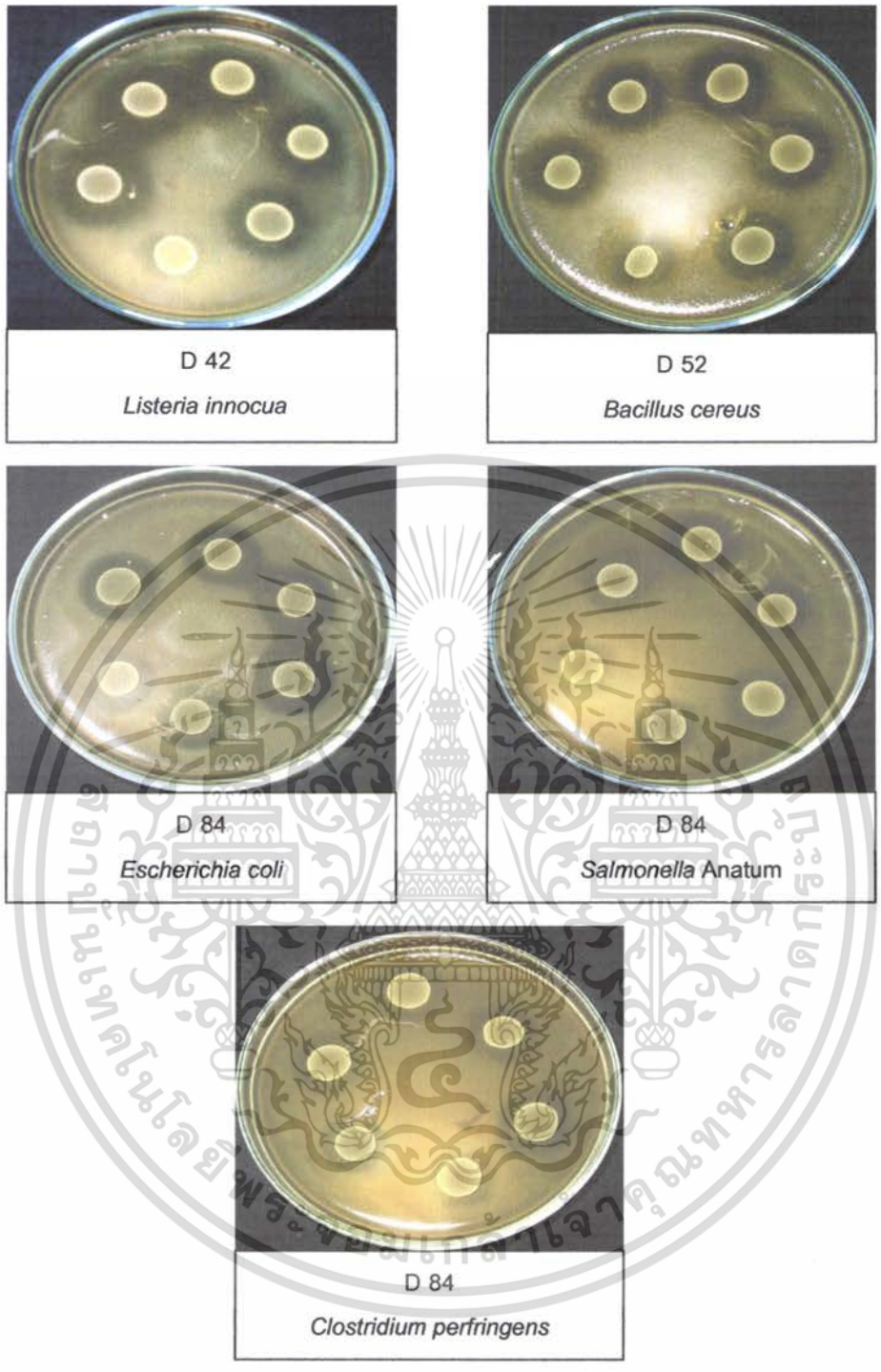
ตารางที่ 5 ผลการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกจากขั้นตอนที่สอง

LAB	ขนาดวงใสการยับยั้ง (mm)											
	MRS agar						BSM agar					
	L	B	E	S	C	St	L	B	E	S	C	St
N5	0.6	0.5	0.6	0.4	0.4	(-)	0.3	0.3	0.2	0.2	0.1	(-)
N11	0.7	0.7	0.8	0.8	0.7	1.1	0.4	0.3	0.4	0.4	0.2	(-)
D8	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6	(-)	0.3	0.3	0.3	0.3	0	(-)
D12	0.7	0.6	0.8	0.8	0.6	(-)	0.5	0.4	0.5	0.3	0.2	(-)
D16	0.5	0.4	0.6	0.6	0.5	(-)	0.2	0.3	0.3	0.3	0.1	(-)
D17	0.5	0.5	0.7	0.6	0.5	0.5	0.2	0.3	0.3	0.2	0.1	(-)
D22	0.9	0.6	0.8	0.7	0.6	(-)	0.3	0.3	0.4	0.5	0.2	(-)
D31	0.6	0.4	0.6	0.6	0.4	(-)	0.4	0.3	0.2	0.2	0.1	(-)
D33	0.6	0.4	0.7	0.5	0.5	0.5	0.3	0.2	0.3	0.3	0	(-)
D34	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	(-)	0.3	0.1	0.2	0.2	0.1	(-)
D42	0.8	0.7	0.8	0.7	0.6	1	0.4	0.4	0.3	0.3	0.2	(-)
D48	0.7	0.7	0.8	0.8	0.7	1.5	0.4	0.4	0.4	0.5	0.1	(-)
D49	0.9	0.8	0.7	0.7	0.8	(-)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	(-)
D52	0.8	0.8	0.7	0.7	0.9	(-)	0.4	0.4	0.4	0.6	0.2	(-)
D53	0.6	0.5	0.6	0.5	0.6	(-)	0.4	0.2	0.3	0.4	0	(-)
D56	0.6	0.5	0.6	0.6	0.6	(-)	0.2	0.2	0.4	0.5	0.1	(-)
D77	0.5	0.6	0.6	0.7	0.6	(-)	0.4	0.2	0.3	0.5	0.1	(-)
D84	0.7	0.8	1.0	0.7	0.7	0.7	0.4	0.2	0.5	0.6	0.2	(-)

หมายเหตุ : L = *Listeria innocua*; B = *Bacillus cereus*; E = *Escherichia coli*; S = *Salmonella* Anatum;
C = *Clostidium perfringens*, St = *Staphylococcus aureus*, (-) = ไม่มีการยับยั้ง

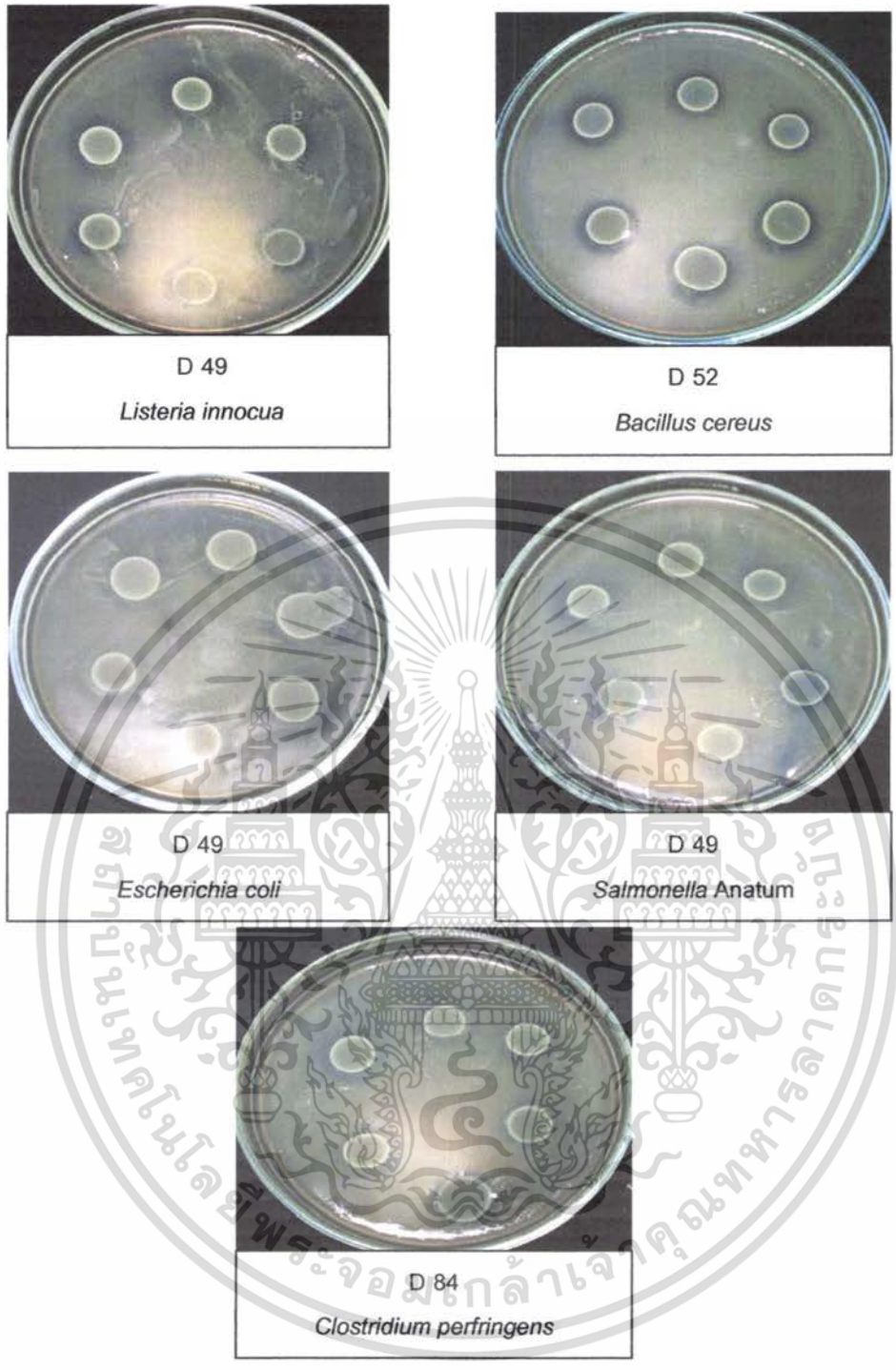
จากผลการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารดังแสดงในตารางที่ 5 สามารถที่จะคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกได้ 8 เชื้อ ประกอบด้วย แบคทีเรียแลกติกรหัส D12, D22, D42, D48, D49, D52, D84, N11 เพื่อใช้ในขั้นตอนสุดท้ายเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถที่จะหมักกากถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 ตัวอย่างของการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคด้วยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



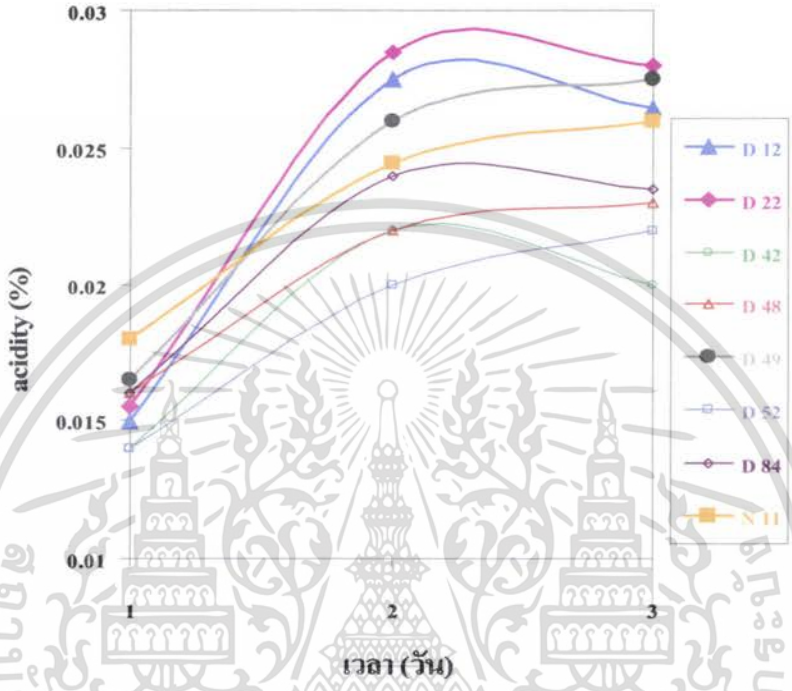
ภาพที่ 6 ตัวอย่างของการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคด้วยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อBacteriocin – Screening Medium (BSM) agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

4.1.4 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีประสิทธิภาพในการหมักกากถั่วเหลือง

จากการทดลองสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลท จากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกไว้ 8 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรียแลกติกรหัส D12 D22 D49 และ N11 (ภาพที่ 5) ซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



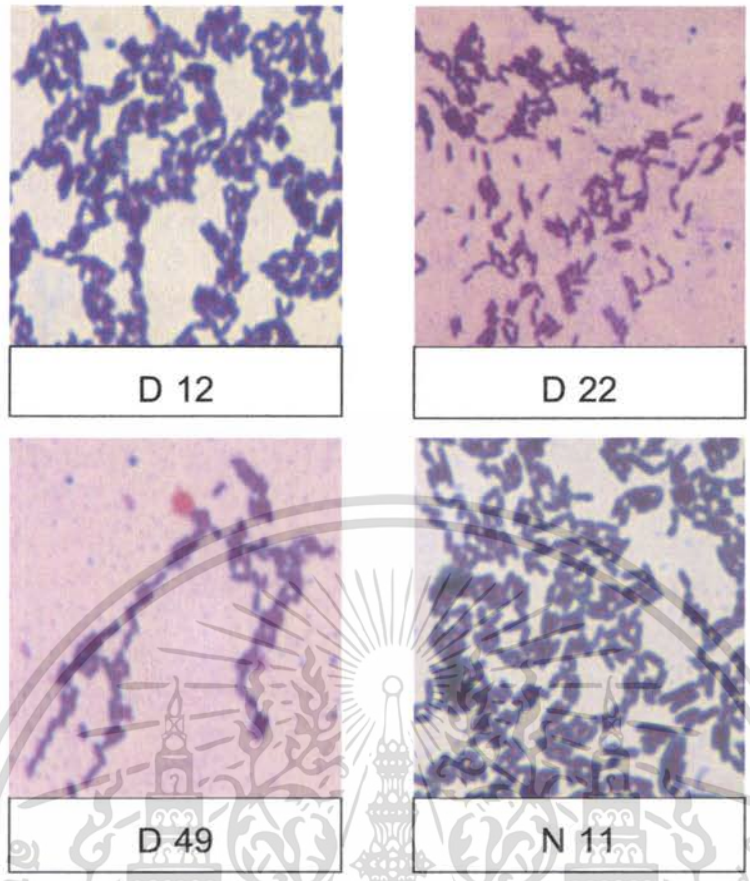
ภาพที่ 7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเพื่อสร้างกรดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากกากถั่วเหลืองเมื่อทำการหมักเป็นเวลา 3 วัน

4.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกในกากถั่วเหลือง

4.2.1 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกในกากถั่วเหลืองขั้นพื้นฐาน

จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้นั้นมีรูปร่างแบบท่อน (rod) จนถึงท่อนสั้น (short rod) แกรมบวก ดังภาพที่ 8 ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและออกซิเดส (Peter et al., 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 8 ตัวอย่างลักษณะทางสรีรวิทยา (ย้อมแกรม) ของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ (ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า)

4.2.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกในกากถั่วเหลืองระดับสกุล

ผลการทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตของเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 4 ไอโซเลทที่คัดเลือกไว้ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์แบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากกากถั่วเหลือง

รหัส	ผลการวิเคราะห์	เปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง (% identification)
D 12	*L.plantarum*	99.9
D 22	*L.plantarum*	99.6
D 49	*L.plantarum*	99.6
N 11	*L.plantarum*	99.4

หมายเหตุ : การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียแลกติกอาศัยการหมักน้ำตาลจำนวน 49 ชนิด ตาม API 50CH system บริษัท bioMérieux

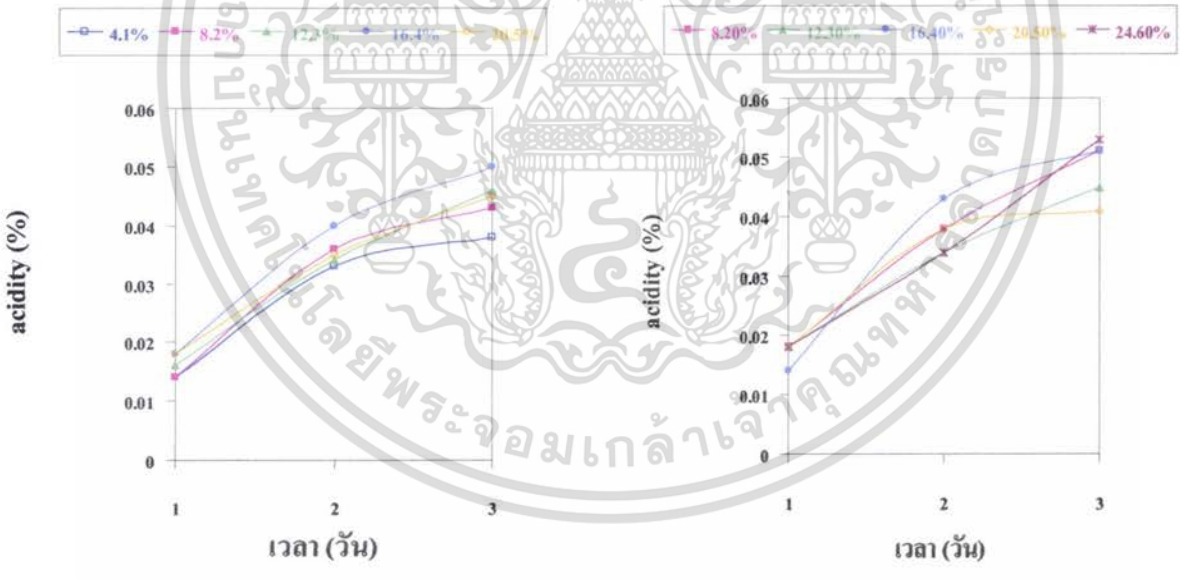
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษา % ความชื้นและระดับความสูงของกากถั่วเหลืองที่เหมาะสมต่อการผลิตอาหารสัตว์จากกากถั่วเหลือง

เนื่องจากกากถั่วเหลืองที่ใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการหมักมีความชื้นน้อยมากทำให้มีสภาพไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติก และพบว่าระดับความสูงของกากถั่วเหลืองที่หมักมีผลต่อการกระจายตัวของออกซิเจนในบริเวณด้านบนของกากถั่วเหลืองจะเป็นการหมักของแบคทีเรียแลกติก ส่วนบริเวณด้านล่างที่ติดกับภาชนะที่ใช้หมักจะเป็นการหมักของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น การหมักกากถั่วเหลืองดังภาพที่ 9 ผลการหมักโดยใช้กากถั่วเหลือง 100 กรัมและ 200 กรัม แสดงดังภาพที่ 10

กากถั่วเหลือง 100 กรัม กากถั่วเหลือง 200 กรัม

ภาพที่ 9 การหมักกากถั่วเหลืองปริมาณต่าง ๆ กัน



กากถั่วเหลือง 100 กรัม กากถั่วเหลือง 200 กรัม

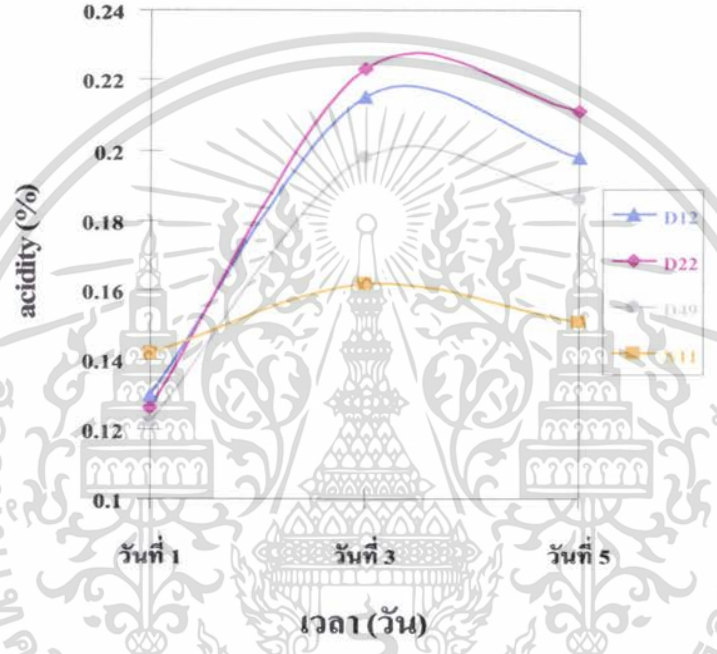
ภาพที่ 10 ปริมาณความชื้นของกากถั่วเหลืองเท่ากับ 100 และ 200 กรัม โดยมีการปรับความชื้นร้อยละต่าง ๆ

จากผลการทดลอง พบว่าการหมักโดยใช้กากถั่วเหลือง 100 กรัม ให้ผลการหมักที่ดีกว่าการหมักโดยใช้กากถั่วเหลือง 200 กรัม และ ปริมาณความชื้นที่เหมาะสมของกากถั่วเหลืองที่ใช้หมัก คือ 16.40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4..4 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตอาหารสัตว์จากกากถั่วเหลือง

จากผลการทดลองในภาพที่ 11 พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 4 ไอโซเลทให้ผลการหมักที่ดีมาก (สร้างกรดได้มาก) ในวันที่ 3 ของการหมัก แต่เมื่อหมักต่อไปจึงถึงวันที่ 5 พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 4 ไอโซเลทจะให้ผลการทดลองเหมือนกัน คือ มีปริมาณกรดทั้งหมดลดลง และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารโดยประมาณ (proximate analysis) ดังตารางที่ 7 พบว่า กากถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักแล้วนั้นมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณไขมันและสารเยื่อใยลดลง



ภาพที่ 11 ผลการหมักกากถั่วเหลืองเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตอาหารสัตว์ของเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 4 ไอโซเลท

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารโดยประมาณ (proximate analysis) ที่ได้หลังจากการหมักเป็นเวลา 5 วัน

รหัสเชื้อ	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	สารเยื่อใย (%)
control	25.94	3.90	4.19
D 12	27.57	1.47	0.58
D 22	29.51	1.69	0.41
D 49	28.88	1.26	1.41
N 11	27.51	1.05	1.16

หมายเหตุ : control คือ กากถั่วเหลืองสด ไม่ผ่านการผสมเชื้อและกากน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

1. จากการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกได้ทั้งหมด 128 เชื้อ โดยได้จากกากถั่วเหลืองบริเวณผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลือง (สัมผัสอากาศ) 30 เชื้อ จากบริเวณที่ลึกจากผิวหน้าของกระบะรับถั่วเหลืองประมาณ 6 นิ้ว 87 เชื้อ และจากตัวอย่างใหม่ (ที่ได้จากการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง) 11 เชื้อ ขั้นตอนที่ 2 เป็นการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ความสามารถในการสร้างกรดและแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก เป็นตัวคัดเลือก สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกได้ 8เชื้อ จาก 128 เชื้อในขั้นตอนแรก และขั้นตอนที่ 3 จะคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกโดยพิจารณาจากความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Listeria innocua* , *Staph. aureus* , *B. cereus* , *E. coli* , *Salmonella* Anatum. และ *Clostidium perfringens* สามารถคัดเลือกได้ 8 เชื้อ จึงได้ทำการศึกษาต่อเพื่อเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการหมักกากถั่วเหลือง และสามารถคัดเลือกมาได้ทั้งหมด 4 เชื้อ ได้แก่เชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีรหัส D12 , D22, D49 และ N11

2. เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 เชื้อมาทำการจำแนกเชื้อจนถึงระดับสกุลโดยอาศัยการหมักน้ำตาลจำนวน 49 ชนิดตาม API 50CH system พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 เชื้อ คือ *Lactobacillus plantarum*

3. จากการนำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้มาทำการศึกษาหา % ความชื้นและระดับความสูงที่เหมาะสมในการหมักกากถั่วเหลืองนั้นพบว่า การหมักโดยใช้กากถั่วเหลือง 100 กรัม และเพิ่มความชื้นของกากให้ได้เท่ากับ 16.4 % จากนั้นอัดให้เหลือความสูง 1.5 เซนติเมตรก่อนการหมัก จะให้ผลการหมักที่มีประสิทธิภาพดี

4. หลังจากทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักกากถั่วเหลืองเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์แล้วพบว่า แบคทีเรียแลกติกทั้ง 4 รหัสสามารถหมักกากถั่วเหลืองได้ดีในวันที่ 2-3 แต่ถ้าหมักนานกว่านี้แบคทีเรียแลกติกจะมีการสร้างกรดลดลง ทำให้ผลการหมักไม่ดีเท่าที่ควร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา นิลนนท์ และ วราวุฒิ ครูส่ง. 2538.**นมเปรี้ยวพร้อมดื่มจากถั่วเหลือง.** วารสารเกษตรพระจอม ปีที่ 13 ฉบับที่ 3. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพ. หน้า 22–29.

กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. **ตารางแสดงคุณค่าโภชนาการของกากถั่วเหลือง 100 กรัม.** available at http://mixfeed.webhostme.com/ WebMixFeed/GenTableMatt.asp?ID=049. 25 February 2004

คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา. 2542.**พืชเศรษฐกิจ.**คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ : 137 – 138

จรูญรัตน์ กิตติพรพานิช. 2529. **การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของกากถั่วเหลืองจากโรงงานเต้าหู้โดยการหมักแบบผสม.**บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ : 143 - 145

นภา โล่ห์ทอง. 2534. **กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต.** หจก. ฟันนี่ พับลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ.

แพรวา ห้องทองแดง, มนวิภา จารุตามระ และยุคล ลิ้มแหลมทอง. 2527. **โครงการวิจัยเรื่องการตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ของผู้ผลิตอาหารสัตว์.** กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์. กรมปศุสัตว์. กรุงเทพฯ: 28-29

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2543. **ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย.** ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22(2) : 177-189

ศิริมา วรรณรังษี. 2545. **การเจริญและกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยในกระบวนการผลิตเซลล์ยีสต์.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพ : 3 – 7, 19

Arimoto, K. 1962. **Nutrition research on fermented soybean products.** Nutr. Abstr. Rev. 32 : 858

Balasubramanyam, B.V. and Varadaraj, M.C. 1998. **Cultural conditions for the production of bacteriocin by a native isolate of *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus* CFR2028 in milk medium.** J. of Appl. Microbiol. 84 : 97-102

Bogovic-Matijasic, B., Rogelj, I., Nes, I. F. and Holo, H. 1998. **Isolation and characterization of two bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* LF221.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 49 : 606-612

Corsetti, A., Gobbetti, M. and Smacchi, E. 1998. **Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria : identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1.** Appl. Microbiol Biotechnol. 50 : 253-256

Delves-Broughton, J. 1990. **Nisin and its use as a food preservative.** Food Technol. 44 : 100-117

Doetsch, R. N. 1981. **Determinative methods of light microscopy.** In P. Gerhardt, et al. (eds.), Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington. : 21-23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fred, B. and Henry, P.F. 1997. **Using Lactic Acid Bacteria to Improve the Safety of Minimally Processed Fruits and Vegetables.** Food Technol. 51 : 44-51

Gilliland, S.E. and Speck, M.L. 1975. **Inhibition of psychrotrophic bacteria by Lactobacilli and Peddiococci in nonfermented refrigerated foods.** J. FoodSci. 40 : 903-905

Halami, P.M., Chandrashekar, A. and Nand, K. 2000. ***Lactobacillus farciminis* MD, A newer strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay.** Let. Appl. Microbial. 30 : 197-202.

Horwitz,W. 2000. **Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th Edition.** Washington D.C.: Association of official Analytical Chemists. : 1–53.

Jay, J.M. 1982. **Antimicrobial properties of diacetyl.** Appl. Environ. Microbiol. 44 : 525-527

Kelly, W.J., Asmundson, R.V. and Huang, C.M. 1996. **Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products.** Int. J. of Food Microbiol. 33 : 209-218

Khachatrjan AP, Khachatrjan RG. 2001. **Method of production of ethyl alcohol and aqueous-spirituous solution from its for vodka production.** US Patent No. RU2171293 Available at http://v3.espacenet.com/textdoc? DB=EPODOC&IDX=RU2171293. 25 February 2004

Kimio, G. 2003. **Beauty messenger using "Dried okara".** US Patent No. JP2003125839. Available at http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX=JP2003125839. 25 February 2004

Klaenhammer, T.R. 1983. **Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.** FEMS Microbiol. Rev. 12 : 39-86

Lejeune, R., Callewaert, R., Crabbe, K. and De Vuyst, L. 1998. **Modeling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation.** J. Appl. Microbiol. 84 : 159-168.

Mark, A.D. 1989. **Antimicrobial Substances from Lactic Acid Bacteria for Use as Food Preservatives.** Food Technol. : 164-167

Miteva, M., Ivanova, I., Budakov, I., Pantev, A., Stefanova, T., Danova, S., Moncheva, P., Mitev, V., Dousset, X. and Boyaval, P. 1998. **Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by a *Lactobacillus delbrueckii* strain 1043.** J. of Appl. Microbiol. 85 : 603-614

Ostergaaed, A., Embarek P.K.B., Wedell-Neergaard. C., Huss H.H. and Gram L. 1998. **Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria from Thai fermented fish products.** Food Microbiol. 15: 223-233

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peter, M.A., Sneath, N.S. and Sharpe, M.E. 1993. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume.2.** Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 965-982.

Pongsak, R. and Parichat, P. 2000. **A Bacteriocin Produced by Lactobacillus lactis subsp. Lactis Isolated from Thai Fermented Foods.** Sci. Asia. 26 : 195-200

Raccach, M., Baker, R.C., Regenstein, J.M. and Mulnix, E.J. 1979. **Potential application of microbial antagonism to extended storage stability of a flesh type food.** J. Food Sci. 44 : 43-46

Reenen, C.A., Dicks, L.M.T. and Chikindas, M.L. 1998. **Isolation purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*.** J. of Appl. Microbiol. 84 : 1131-1137

Romick, T.L. 1994. **Biocontrol of Listeria monocytogens, a psychrotrophic pathogen model, in low salt, non-acidified, refrigerated vegetable product.** Ph. D. thesis. North Carolina State University, United State : 41-50

Saleh, M.A., and Ordal, Z.J. 1955. **Studies on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in a precooked frozen food.** Food Res. 20 : 340-350

Salminen , S. and von Wright , A. 1993. **Lactic Acid Bacteria.** Dekker,1993 : 18 , 22

Spelhaug, S.R. and Harlander. S.K. 1989. **Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentasaceous*.** J. Food Prot. 52 : 856-862.

Swetwiwathana , A., and Lotong, N. 1999. **Selection of Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria from Nham (Thai Fermented meat).** Proceeding of International Conference on ASIAN Network on Microbial Research. November 29 December 1 , 1999. Chiangmai, Thailand.

Ueda Michio, Shiodaeiji, Hama Yoshiaki, Izutsu Ko, Nakanishi Takaro. 1997. **Paper using okara and its production.** US Patent No. JP9132895 Available at http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX=JP9132895. 25 February 2004

Verna, C. M., Gottlieb, A., John, W. H. 1997. **Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers.** Inter. J. of Food Microbiol. 34 : 1-16

Vescovo, M., Torriani, S., Orsi, C., Macchiarlol, F. and Scolari, G. 1996. **Application of antimicrobial-producing lactic acid bacteria to control pathogens I ready-to-use vegetable.** J. Appl. Bacteriol. 81 : 113-119

Yokie. S. 2000. **Production of health food containing okara as main ingredient.** US Patent No. JP2000102363 Available athttp://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX=JP2000102363. 25 February 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

DE MAN , ROGOSA and SHARPE (MRS)

bacto proteose peptone No.3	10.0 g
bacto meat extract	10.0 g
bacto yeast extract	5.0 g
dextrose	20.0 g
tween 80	1.0 ml
K_2HPO_4	2.0 g
ammonium citrate	2.0 g
sodium acetate	5.0 g
magnesium sulfate	0.1 g
$MnSO_4.4H_2O$	0.05 g
Agar	15.0 g
pH 6.2 – 6.4	

ละลายอาหาร 55 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เติมผงวุ้นปริมาณ 15 กรัมลงไป ต้มให้วุ้นละลาย ใส่อาหารวุ้น MRS ที่หลอมเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับกรณีการตรวจการสร้างกรดของแบคทีเรียแลกติกให้เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 5 % ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

<u>Bacteriocin Screening medium</u> (BSM)

Glucose	2 g
Meat extract	2 g
Tryptone	10 g
Yeast extract	4 g
Tween – 80	1 ml
Citric acid diammonium Salt	2 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g
$MnSO_4.4H_2O$	0.05 g
$K_2HPO_4.3H_2O$	8.7 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KH_2PO_4	8 g
Dw	1 lit
Agar	15 g

ละลายอาหาร 55 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เติมผงวุ้นปริมาณ 15 กรัมลงไป ต้มให้วุ้นละลาย ใส่อาหารวุ้น BSM ที่หลอมเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

* BSM เป็นอาหารที่เหมาะกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติก จากสูตรของอาหารจะเห็นว่าปริมาณของน้ำตาลจะน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และมีการเติมทั้งโปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตลงไปในอาหารด้วยเพื่อที่จะช่วยปรับค่าความเป็นกรดความเป็นกรด – ด่างของอาหารให้มีสภาวะเป็นกลาง เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM มาทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลกติกจะสามารถรู้ได้อย่างชัดเจนว่าเมื่อเกิดบริเวณใส (Clear Zone) ล้อมรอบโคโลนี คือ การสร้างเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยเชื้อที่ผสมอยู่ใน soft agar ซึ่งจะเป็นสารพิษต่อเชื้อจุลินทรีย์ ไม่ใช่เป็นการสร้างกรดแลกติกเหมือนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Trypticase soy broth (TSB)

ชั่ง TSB จำนวน 30 กรัม และ yeast extract 0.6 % ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกรอง 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

TSAYE soft agar

TSB	30 กรัม
Yeast extract	0.6 %
ผงวุ้น	0.7 %

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้วุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์และทางเคมี

1. การย้อมแกรม

1.1 สารละลายแกรมคริสตัลไวโอเลต ประกอบด้วย

สารละลาย A

คริสตัลไวโอเลต	2.0 กรัม
เอทานอล 95 %	2.0 กรัม

สารละลาย B

แอมโมเนียมออกซาเลต	0.8 กรัม
น้ำกลั่น	80 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ให้เข้ากัน

1.2 สารละลายแกรมไอโอดีน

ไอโอดีน	1.0 กรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์	2.0 กรัม
น้ำกลั่น	300 มิลลิลิตร

บดไอโอดีนและโพแทสเซียมไอโอไดด์ให้ละเอียด แล้วค่อย ๆ เติมน้ำลงไปทีละน้อย จนไอโอดีนละลายหมด เก็บในขวดแก้วสีน้ำตาล

1.3 สารละลายซาฟรานินโอ

ซาฟรานินโอ	0.25 กรัม
เอทานอล 95%	10.0 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

2. Total acid

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน

น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์	1 ลิตร
สารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH	4 กรัม

ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดพลาสติก นำมาหาความเข้มข้นมาตรฐานก่อนใช้

การหาความเข้มข้นมาตรฐาน 0.1 N NaOH ทำได้โดยชั่ง acid potassium phthalate (potassium hydrogen phthalate $COOH.C_6H_4.COOK$ analytical reagent) อบ 2 ชั่วโมง ที่ 120 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่งอย่างละเอียดประมาณ 0.6000 - 0.7000 กรัม เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนไดออกไซด์ 90 – 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล์ฟธาลีน 2 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลาย 0.1 N NaOH ความเข้มข้นมาตรฐานคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (N)} = \frac{\text{กรัมของ } COOH.C_6H_4.COOH \times 1000}{\text{มิลลิลิตรของ NaOH} \times 204.22}$$

2. Phenolphthalein

ฟีนอล์ฟธาลีน (Phenolphthalein)	1 กรัม
แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	100 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด (total acids)

ดัดแปลงมาจาก AOAC (2000) คิดในรูปกรดแลคติก ($CH_3CH(OH)\ COOH$ MW. = 90.08)

นำตัวอย่าง 2 กรัม มาเจือจางด้วยน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 30 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล์ฟธาลีน 3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึง end point สีชมพู ปริมาณกรดคำนวณเป็นกรดแลกติก ตามสูตร

$$\text{กรดทั้งหมด (กรัมต่อ 100 กรัม)} = \frac{N \times V \times 90.08 \times 100}{1000 \times 2}$$

กำหนดให้ N = ความเข้มข้นมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

3. Proximate analysis

1. Anhydrous ether
2. Conc. H_2SO_4 93 – 98 %
3. Boric acid 2%
4. HCl 0.1 N
5. NaOH 30%
6. Catalyst

SeO_2	2.5 กรัม
K_2SO_4	100 กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	20 กรัม

ผสมคะตะลิสต์ทั้ง 3 เข้าด้วยกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. Mixed indicator

ก. เตรียม 0.1% Bromocresol green ใน 95% alcohol และ 0.1% Methyl red ใน 95% alcohol

ข. ผสม 10 มิลลิลิตร Bromocresol green กับ 2 มิลลิลิตร Methyl red ใน ขวดหยด สารละลายดังกล่าว 4 หยดมีปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร

8. H_2SO_4 0.255 N

9. NaOH 0.313 N

10. K_2SO_4 10%

วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบในอาหารโดยประมาณ (proximate analysis)

1. ปริมาณความชื้น

นำกากถั่วเหลือง จำนวน 5 กรัม บรรจุใน aluminum can นำไปเข้าตู้อบ โดยใช้อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำกากถั่วเหลืองที่อบแล้วเข้าโถอบแห้งเพื่อดูดความชื้น (อย่าปิดฝา aluminum can)ทิ้งไว้ให้เย็น จึงเอาออกมาชั่ง (ก่อนหยิบออกจากโถอบแห้งให้ปิดฝา aluminum can ให้สนิท) บันทึกน้ำหนักไว้ จากนั้นนำเข้าตู้อบอีกครั้ง จนได้เวลาตามต้องการ นำเข้าโถอบแห้งเพื่อดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น จึงเอาออกมาชั่ง ทำซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งน้ำหนักที่หายไปจะเป็นน้ำหนักของความชื้น

การคำนวณ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(a - b)}{w} \times 100$$

a = น้ำหนักของอาหารก่อนอบแห้ง

b = น้ำหนักของอาหารหลังอบแห้ง

w = น้ำหนักของอาหารก่อนอบ

หรือ % ของวัตถุแห้ง (DM) = 100 - % ความชื้น

2. ปริมาณไขมัน

นำกากถั่วเหลืองที่อบแห้งแล้ว 3 - 4 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรองใส่ใน thimble จากนั้นจึงนำ thimble บรรจุในชุดสกัดไขมัน soxhlet โดย thimble อยู่ใน extraction tube ซึ่งด้านบนต่อกับ condenser ส่วนด้านล่าง ต่อกับ round bottom flask ชนิด 2 หรือ 3 คอ ตวง anhydrous ether 140 ml ในขวดแก้วก้นกลม ต่อสายยางนำน้ำเข้า – ออกจาก condenser ก่อนเปิดสวิตช์ของเตา heating mantle ปรับระดับความร้อนอย่างเหมาะสม (เช่น 150 หยดต่อนาที) เพื่อให้ไอของ anhydrous ether ควบแน่นหยดลงบนตัวอย่างอย่างต่อเนื่อง นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นแยก anhydrous ether ออกด้วย vacuum evaporator นำส่วนของไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาที ไล่ ether จนหมดนำไปทำให้เย็น ใน desicator ก่อนนำไปชั่งน้ำหนักของ crude fat เตรียมบีกเกอร์แห้งสะอาดทราบน้ำหนักมาก่อน สำหรับชั่งน้ำมันที่สกัดได้ ในกรณีที่ปริมาณน้ำมันน้อยให้ชั่งน้ำมันที่สกัดได้ในภาชนะเดิม

การคำนวณ

$$\text{คำนวณเปอร์เซ็นต์ไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักบีกเกอร์และไขมัน} - \text{น้ำหนักบีกเกอร์} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง}}$$

ข้อแนะนำ

นิยมใช้ anhydrous ethyl ether หรือ petroleum ether (จุดเดือด 35 องศาเซลเซียส) ในการสกัดนำมันจากตัวอย่างอาหาร petroleum ether มีราคาถูก ส่วน diethyl ether ควรเลือกใช้ชนิด anhydrous นี้ เนื่องจากถ้ามีน้ำปะปนมาจะสามารถละลายน้ำตาลและสารประกอบอื่นได้

3. ปริมาณโปรตีน

นำกากถั่วเหลือง 1 กรัม ใส่ลงในขวด Kjeldahl flask 250 ml อย่าให้กากถั่วเหลืองเลอะคอขวด เติม catalyst 7 กรัม กรดซัลฟูริคเข้มข้น 25 ml และ boiling chips จากนั้นนำ Kjeldahl flask ตั้งบนเตาของชุดย่อยโปรตีนที่มีระบบดูดควันที่ดี ใช้ความร้อนต่ำ ประมาณ 5 นาทีก่อนเร่งความร้อนให้สูงขึ้น ย่อยโปรตีนจนได้สารละลายสีฟ้าใส (นานประมาณ 1 ชั่วโมง) ขณะย่อยโปรตีนหมุนขวดเป็นระยะ ๆ รอให้สารละลายสีฟ้าเย็นและหมดควันของไอกรด ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนกากถั่วเหลือง เปิดชุดกลั่นโปรตีนและผ่านน้ำเย็นเข้า – ออก condenser เปิดสวิทช์ของชุดกลั่นให้มีความร้อนเพียงพอในขณะเริ่มต้นกลั่นและป้องกันการไหลย้อนกลับของสารละลายที่ใช้เก็บแอมโมเนีย ดูดกรดบอริค 10 ml ใน Erlenmeyer flask 500 ml ที่แห้งและสะอาด หยด mixed indicator 4 หยด เขย่าให้ดีก่อนนำไปวางใต้เครื่องเครื่องกลั่นโดยให้ปลาย condenser จุ่มลงในสารละลาย ประกอบเข้าชุดกลั่น แอมโมเนียที่เกิดจากปฏิกิริยาจะผ่าน condenser ลงสู่สารละลายบอริค สีของสารละลายเปลี่ยนจากม่วง – น้ำเงิน (bluish purple) ไปเป็นเขียว – น้ำเงิน (bluish green) การเปลี่ยนสีเป็นไปอย่างรวดเร็วประมาณ 20 – 30 วินาที เมื่อสารละลายบอริคเปลี่ยนสีประมาณ 5 นาที ลดระดับของ Erlenmeyer flask ให้ปลาย condenser อยู่เหนือระดับของของเหลว 1 เซนติเมตร ล้างปลาย condenser ด้วยน้ำกลั่น รอให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไปอีกประมาณ 1 – 2 นาที ก่อนนำไปไตเตรตกับสารละลายไฮโดรคลอริค 0.1 N จนสีน้ำเงินเปลี่ยนไปเป็นใส – ไม่มีสี

ข้อแนะนำ อาจไตเตรตจนเป็นสีชมพู ลบปริมาตรของไฮโดรคลอริคออก 0.02 ml จะทำให้สังเกต end point ได้ง่ายขึ้นเนื่องจากสีชมพูจะเข้มข้นเมื่อหยดไฮโดรคลอริคเกินเพียงหยดเดียว

การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{[(A - B) - 0.02] \times CD \times 100}{G \times 1000}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์โปรตีน = (% ไนโตรเจน) x 6.25

เมื่อ A = มล.ของสารละลายไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตกับตัวอย่าง

B = มล.ของสารละลายไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตกับ blank

C = ความเข้มข้น (N) ของกรดไฮโดรคลอริก

D= 14

G= น้ำหนักของตัวอย่าง

4. <u>ปริมาณสารเยื่อใย</u>

ชั่งกากถั่วเหลือง 2 กรัม ใน digestion flask (500-700 มล.) ซึ่งเป็นขวดแก้วก้นกลม เติมกรดซัลฟูริกที่ผ่านการต้มเดือดแล้วจำนวน 200 มล. และ boiling chips 2-3 ชิ้น ก่อนนำ condenser มาประกอบตอนบนของเหลว นำไปต้มบนเตาของชุดย่อย crude fiber โดยให้สารละลายเดือดนาน 30 นาทีต่อเนื่องกัน เขย่าขวดเพื่อไม่ให้ตัวอย่างเกาะบนผนังขวด กรองกากด้วยผ้ากรองบน buchner funnel และใช้ปั๊มช่วยในการกรอง ล้างกากด้วยน้ำเดือดจนหมดฤทธิ์กรด โดยทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส เทกากกลับไปใน digestion flask เติมสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ ที่ผ่านการต้มเดือด จำนวน 200 มล. ต้มส่วนผสมนาน 30 นาที กรองทันทีและล้างกากด้วยน้ำเดือดจนหมดฤทธิ์ด่าง ล้างกากด้วยสารละลายโปตัสเซียมซัลเฟตร้อน เทกากกลับไปใน digestion flask อีกครั้ง ล้างตะกอนที่ติดผ้ากรองด้วยน้ำเดือดหลาย ๆ ครั้ง เทกากใน digestion flask ผ่านไปใน sintered glass crucible ล้างกากด้วยน้ำเดือดหลาย ๆ ครั้ง ล้างกากด้วยแอลกอฮอล์ จำนวน 30 มล. อบ crucible พร้อมกากที่อุณหภูมิ 100.5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชม. ชั่งน้ำหนักเมื่อเย็นลง นำไปเผาใน muffle furnace ที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที เพื่อขจัดสาร volatile organic นำ crucible มาทำให้เย็นใน desicator ก่อนชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่หายไป เป็นน้ำหนักของ crude fiber

การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์crude fiber} = \frac{\text{น้ำหนัก crude fiber x 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ 8 ผลการวัดขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อ ***Listeria innocua*** โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกากถั่วเหลือง โดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง

LAB	ขนาดวงใสการยับยั้ง (mm.)							
	MRS				BSM			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
N 5	0.6	0.7	0.6	0.6	0.2	0.4	0.3	0.3
N 11	-	0.7	0.7	0.7	0.3	0.4	0.4	0.4
D 8	-	0.5	0.7	0.6	0.2	0.4	0.3	0.3
D 12	0.9	0.6	0.7	0.7	0.4	0.5	0.6	0.5
D 16	0.5	0.5	0.4	0.5	0.2	0.2	0.3	0.2
D 17	(-)	0.5	0.5	0.5	0.2	0.3	0.2	0.2
D 22	1.2	0.9	0.7	0.9	0.3	0.3	0.3	0.3
D 31	0.8	0.5	0.6	0.6	0.3	0.5	0.4	0.4
D 33	(-)	0.6	0.6	0.6	0.3	0.3	0.3	0.3
D 34	0.8	0.6	0.5	0.6	0.2	0.3	0.3	0.3
D 42	(-)	0.8	(-)	0.8	0.3	0.5	0.4	0.4
D 48	(-)	0.7	(-)	0.7	0.4	0.5	0.4	0.4
D 49	(-)	0.9	(-)	0.9	0.4	0.4	0.5	0.4
D 52	0.7	0.9	(-)	0.8	0.3	0.5	0.4	0.4
D 53	(-)	0.6	0.6	0.6	0.4	0.5	0.4	0.4
D 56	0.7	0.6	0.6	0.6	0.2	0.2	0.2	0.2
D 77	0.6	0.5	0.5	0.5	0.4	0.3	0.4	0.4
D 84	(-)	0.7	0.7	0.7	0.3	0.4	0.4	0.4

หมายเหตุ N คือ เชื้อแลกติกที่คัดเลือกมาจากกากถั่วเหลืองใหม่

D คือ เชื้อแลกติกที่คัดเลือกมาจากกากถั่วเหลืองลึก 1 คืบ

MRS คือ อาหารสำหรับทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียแลกติก

BSM คือ อาหารสำหรับทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก

(-) ไม่สามารถวัดวงใสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 ผลการวัดขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อ ***Bacillus cereus*** โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกากถั่วเหลือง โดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง

LAB	ขนาดวงใสการยับยั้ง (mm.)									
	MRS					BSM				
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย
N 5	0.6	0.4	0.5	0.5	0.5	0.3	0.2	0.4	0.3	0.3
N 11	0.5	0.7	0.7	0.7	0.7	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3
D 8	0.6	0.7	0.7	0.5	0.6	0.4	0.3	0.3	0.2	0.3
D 12	0.4	0.8	0.6	0.5	0.6	0.4	0.3	0.4	0.5	0.4
D 16	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3
D 17	0.5	(-)	0.6	0.5	0.5	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3
D 22	0.4	0.5	0.7	0.8	0.6	0.3	0.2	0.4	0.2	0.3
D 31	0.5	0.4	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3
D 33	0.4	0.3	0.4	0.5	0.4	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2
D 34	0.8	0.5	0.5	0.6	0.6	0.1	(-)	0.1	0.1	0.1
D 42	0.7	0.6	0.6	0.9	0.7	0.4	0.5	0.4	0.3	0.4
D 48	0.8	0.9	0.6	0.6	0.7	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4
D 49	1.0	0.9	0.6	0.7	0.8	0.4	0.5	0.4	0.3	0.4
D 52	0.8	1.1	0.5	0.9	0.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.4
D 53	0.6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2
D 56	0.8	0.4	0.3	0.4	0.5	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2
D 77	0.6	0.7	0.4	0.6	0.6	0.1	0.2	(-)	0.2	0.2
D 84	1.0	1.0	0.6	0.6	0.8	(-)	0.3	(-)	0.1	0.2

หมายเหตุ N คือ เชื้อแลกติกที่คัดเลือกมาจากกากถั่วเหลืองใหม่

D คือ เชื้อแลกติกที่คัดเลือกมาจากกากถั่วเหลืองลึก 1 คืบ

MRS คือ อาหารสำหรับทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียแลกติก

BSM คือ อาหารสำหรับทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก

(-) ไม่สามารถวัดวงใสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ผลการวัดขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกากถั่วเหลือง โดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง

LAB	ขนาดวงใสการยับยั้ง (mm.)									
	MRS					BSM				
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย
N 5	0.6	(-)	0.7	0.5	0.6	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2
N 11	1.0	(-)	0.8	0.7	0.8	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4
D 8	0.8	0.8	0.6	0.6	0.7	0.2	0.3	0.3	0.4	0.3
D 12	1.1	(-)	0.6	0.7	0.8	0.5	0.4	0.5	0.6	0.5
D 16	0.6	(-)	0.6	0.5	0.6	0.3	0.3	(-)	0.4	0.3
D 17	0.6	0.9	0.7	0.6	0.7	0.4	0.3	(-)	0.3	0.3
D 22	0.9	(-)	0.7	0.8	0.8	0.3	0.5	(-)	0.4	0.4
D 31	0.6	(-)	0.6	0.5	0.6	0.1	0.2	(-)	0.2	0.2
D 33	0.9	0.6	0.6	0.7	0.7	0.4	0.3	(-)	0.3	0.3
D 34	0.7	(-)	0.7	0.5	0.6	0.2	0.2	(-)	0.1	0.2
D 42	1.0	(-)	0.6	0.8	0.8	0.3	0.4	(-)	0.3	0.3
D 48	0.8	(-)	0.9	0.7	0.8	0.5	0.4	(-)	0.4	0.4
D 49	0.9	(-)	0.7	0.6	0.7	0.4	0.3	(-)	0.5	0.4
D 52	0.9	(-)	0.6	0.6	0.7	0.4	0.5	(-)	0.4	0.4
D 53	0.8	(-)	0.5	0.6	0.6	0.3	0.4	(-)	0.3	0.3
D 56	0.5	0.7	0.6	0.6	0.6	0.3	0.5	(-)	0.4	0.4
D 77	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3
D 84	1.3	(-)	0.9	0.9	1.0	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5

หมายเหตุ N คือ เชื้อแลกติกที่คัดเลือกมาจากกากถั่วเหลืองใหม่

D คือ เชื้อแลกติกที่คัดเลือกมาจากกากถั่วเหลืองลึก 1 คืบ

MRS คือ อาหารสำหรับทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียแลกติก

BSM คือ อาหารสำหรับทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก

(-) ไม่สามารถวัดวงใสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 ผลการวัดขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อ ***Salmonella anatum*** โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกากถั่วเหลือง โดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง

LAB	ขนาดวงใสการยับยั้ง (mm.)									
	MRS					BSM				
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย
N 5	0.5	0.4	0.4	(-)	0.4	0.2	0.3	0.1	0.2	0.2
N 11	0.8	0.9	0.7	(-)	0.8	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4
D 8	0.5	0.6	0.6	(-)	0.6	0.2	0.4	0.3	0.3	0.3
D 12	0.9	0.8	0.7	(-)	0.8	0.5	0.5	0.6	0.5	0.5
D 16	(-)	0.7	0.5	0.6	0.6	0.3	0.2	0.4	0.3	0.3
D 17	0.8	0.6	0.5	0.5	0.6	0.4	0.3	0.3	0.2	0.3
D 22	0.6	0.8	0.6	0.9	0.7	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4
D 31	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2
D 33	0.4	0.3	0.6	0.6	0.5	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3
D 34	0.8	0.6	0.5	0.6	0.6	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2
D 42	0.7	0.9	0.5	0.7	0.7	0.4	0.3	0.3	0.2	0.3
D 48	1.0	0.8	0.7	0.8	0.8	0.4	0.5	0.4	0.3	0.4
D 49	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.4	0.3	0.5	0.4	0.4
D 52	0.8	0.7	0.7	0.6	0.7	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4
D 53	0.5	0.6	0.5	0.4	0.5	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3
D 56	0.7	0.5	0.5	0.7	0.6	0.5	0.4	0.4	0.3	0.4
D 77	0.9	0.7	0.5	0.7	0.7	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3
D 84	0.8	(-)	0.6	0.7	0.7	0.6	0.5	0.4	0.5	0.5

หมายเหตุ N คือ เชื้อแลกติกที่คัดเลือกมาจากกากถั่วเหลืองใหม่

D คือ เชื้อแลกติกที่คัดเลือกมาจากกากถั่วเหลืองลึก 1 คืบ

MRS คือ อาหารสำหรับทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียแลกติก

BSM คือ อาหารสำหรับทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก

(-) ไม่สามารถวัดวงใสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 ผลการวัดขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อ ***Clostridium perfringen*** โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกากถั่วเหลืองโดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง

LAB	ขนาดวงใสการยับยั้ง (mm.)									
	MRS					BSM				
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ค่าเฉลี่ย
N 5	0.4	(-)	0.4	0.3	0.4	(-)	0.1	0.1	(-)	0.1
N 11	0.8	(-)	0.7	0.6	0.7	(-)	(-)	0.1	0.2	0.2
D 8	0.7	(-)	0.7	0.8	0.6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
D 12	0.6	(-)	0.6	0.5	0.6	(-)	0.3	0.2	0.2	0.2
D 16	0.4	(-)	0.4	0.6	0.5	(-)	0.1	0.1	0.1	0.1
D 17	0.6	(-)	0.5	0.5	0.5	(-)	0.1	0.1	0.1	0.1
D 22	0.7	(-)	0.6	0.5	0.6	0.3	0.3	0.1	0.2	0.2
D 31	0.4	(-)	0.4	0.5	0.4	(-)	0.2	0.1	0.1	0.1
D 33	0.5	(-)	0.4	0.5	0.5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
D 34	0.7	(-)	0.4	0.3	0.5	(-)	0.1	0.2	0.1	0.1
D 42	0.6	(-)	(-)	0.6	0.6	(-)	(-)	0.2	(-)	0.2
D 48	0.7	(-)	(-)	0.7	0.7	4.00	(-)	(-)	0.1	0.1
D 49	0.8	(-)	(-)	0.8	0.8	(-)	0.2	0.2	(-)	0.2
D 52	0.9	(-)	(-)	0.9	0.9	0.3	0.2	0.2	(-)	0.2
D 53	0.7	(-)	0.5	0.7	0.6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
D 56	0.4	(-)	0.8	0.7	0.6	0.2	(-)	0.1	0.1	0.1
D 77	0.5	(-)	0.6	0.6	0.6	(-)	0.1	0.1	(-)	0.1
D 84	0.8	(-)	0.8	0.5	0.7	(-)	0.2	0.2	(-)	0.2

หมายเหตุ N คือ เชื้อแลกติกที่คัดเลือกมาจากกากถั่วเหลืองใหม่

D คือ เชื้อแลกติกที่คัดเลือกมาจากกากถั่วเหลืองลึก 1 คืบ

MRS คือ อาหารสำหรับทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียแลกติก

BSM คือ อาหารสำหรับทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก

(-) ไม่สามารถวัดวงใสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 ผลการวัดขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อ ***Staphylococcus aureus*** โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกากถั่วเหลืองโดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง

LAB	ขนาดวงใสการยับยั้ง (mm.)	
	MRS	BSM
N 5	(-)	(-)
N 11	11.00	(-)
D 8	(-)	(-)
D 12	(-)	(-)
D 16	(-)	(-)
D 17	3.00	(-)
D 22	(-)	(-)
D 31	(-)	(-)
D 33	8.00	(-)
D 34	(-)	(-)
D 42	10.00	(-)
D 48	15.00	(-)
D 49	(-)	(-)
D 52	(-)	(-)
D 53	(-)	(-)
D 56	(-)	(-)
D 77	(-)	(-)
D 84	7.00	(-)

หมายเหตุ N คือ เชื้อแลกติกที่คัดเลือกมาจากกากถั่วเหลืองใหม่

D คือ เชื้อแลกติกที่คัดเลือกมาจากกากถั่วเหลืองลึก 1 คืบ

MRS คือ อาหารสำหรับทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียแลกติก

BSM คือ อาหารสำหรับทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก

(-) ไม่สามารถวัดวงใสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีประสิทธิภาพในการหมักกากถั่วเหลือง

รหัส	วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3			
	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ (ml)			acidity (%)*	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ (ml)			acidity (%)*	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ (ml)			acidity (%)*
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
D12	0.175	0.175	0.20	0.0150	0.30	0.35	0.30	0.0275	0.325	0.325	0.325	0.0265
D22	0.175	0.20	0.20	0.0155	0.35	0.35	0.35	0.0285	0.350	0.325	0.350	0.0280
D42	0.175	0.175	0.175	0.0140	0.275	0.275	0.25	0.0220	0.25	0.225	0.225	0.0200
D48	0.20	0.225	0.175	0.0160	0.25	0.275	0.275	0.0220	0.275	0.30	0.275	0.0230
D49	0.20	0.20	0.20	0.0165	0.30	0.325	0.325	0.0260	0.35	0.35	0.325	0.0275
D52	0.175	0.175	0.175	0.0140	0.225	0.25	0.225	0.0200	0.25	0.275	0.275	0.0220
D84	0.225	0.175	0.20	0.0160	0.30	0.30	0.30	0.0240	0.275	0.30	0.30	0.0235
N11	0.225	0.225	0.225	0.0180	0.30	0.325	0.275	0.0245	0.325	0.30	0.325	0.0260

* การคำนวณ % กรด คำนวณจาก

$$\%\ \text{กรด} = \frac{([\text{NaOH}] \times \text{ปริมาณ NaOH ที่ใช้} \times 90.08 \times 100)}{1000 \times 2}$$

ตารางที่ 15 ผลการหมักเพื่อหาปริมาณความชื้นและระดับความสูงที่เหมาะสมของกากถั่วเหลืองที่ใช้หมัก โดยใช้กากถั่วเหลือง 100 กรัม

% moisture	วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3			
	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ (ml)			acidity (%)	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ (ml)			acidity (%)	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ (ml)			acidity (%)
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
4.1	0.15	0.175	0.175	0.014	0.40	0.40	0.425	0.033	0.475	0.475	0.45	0.038
8.2	0.175	0.15	0.175	0.014	0.425	0.45	0.45	0.036	0.55	0.525	0.525	0.043
12.3	0.20	0.20	0.175	0.016	0.425	0.40	0.425	0.034	0.525	0.55	0.55	0.046
16.4	0.225	0.20	0.225	0.018	0.5	0.5	0.475	0.04	0.625	0.60	0.625	0.05
20.5	0.20	0.225	0.225	0.018	0.45	0.425	0.45	0.035	0.575	0.55	0.55	0.045

* การคำนวณ % กรด คำนวณจาก

$$\% \text{ กรด} = \frac{([\text{NaOH}] \times \text{ปริมาณ NaOH ที่ใช้} \times 90.08 \times 100)}{1000 \times 2}$$

ตารางที่ 16 ผลการหมักเพื่อหาปริมาณความชื้นและระดับความสูงที่เหมาะสมของกากถั่วเหลืองที่ใช้หมัก โดยใช้กากถั่วเหลือง 200 กรัม

% moisture	วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3			
	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ (ml)			acidity (%)	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ (ml)			acidity (%)	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ (ml)			acidity (%)
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
8.2	0.20	0.225	0.225	0.018	0.45	0.475	0.475	0.038	0.65	0.625	0.625	0.051
12.3	0.20	0.225	0.225	0.018	0.425	0.425	0.40	0.034	0.55	0.575	0.55	0.045
16.4	0.15	0.175	0.175	0.014	0.55	0.525	0.525	0.043	0.625	0.65	0.625	0.051
20.5	0.225	0.225	0.20	0.018	0.475	0.475	0.45	0.038	0.50	0.50	0.525	0.041
24.6	0.225	0.20	0.225	0.018	0.40	0.425	0.425	0.034	0.65	0.65	0.65	0.053

* การคำนวณ % กรด คำนวณจาก

$$\% \text{ กรด} = \frac{([\text{NaOH}] \times \text{ปริมาณ NaOH ที่ใช้} \times 90.08 \times 100)}{1000 \times 2}$$

ตารางที่ 17 ผลการหมักหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตอาหารสัตว์จากกากถั่วเหลือง

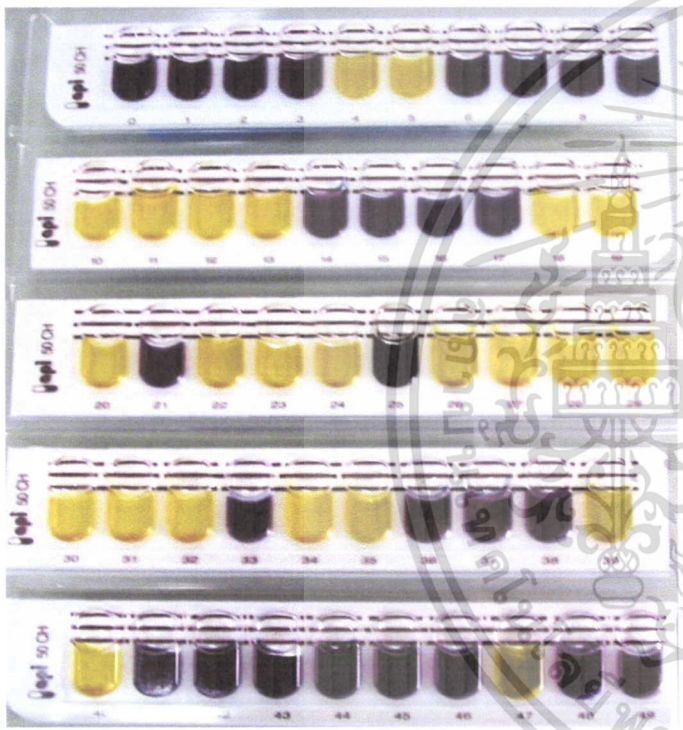
รหัส	วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3			
	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ (ml)			acidity (%)	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ (ml)			acidity (%)	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ (ml)			acidity (%)
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
D12	1.50	1.50	1.75	0.13	2.50	2.75	2.75	0.215	2.25	2.50	2.50	0.198
D22	1.55	1.55	1.55	0.126	2.75	2.75	2.75	0.223	0.275	0.250	0.275	0.211
D42	1.50	1.50	1.50	0.122	2.50	2.25	2.50	0.198	2.25	2.50	2.25	0.186
N11	1.75	1.75	1.75	0.142	2.00	2.00	2.00	0.162	2.00	1.75	1.75	0.151

* การคำนวณ % กรด คำนวณจาก

$$\% \text{ กรด} = \frac{([\text{NaOH}] \times \text{ปริมาณ NaOH ที่ใช้} \times 90.08 \times 100)}{1000 \times 2}$$

ภาคผนวก ง

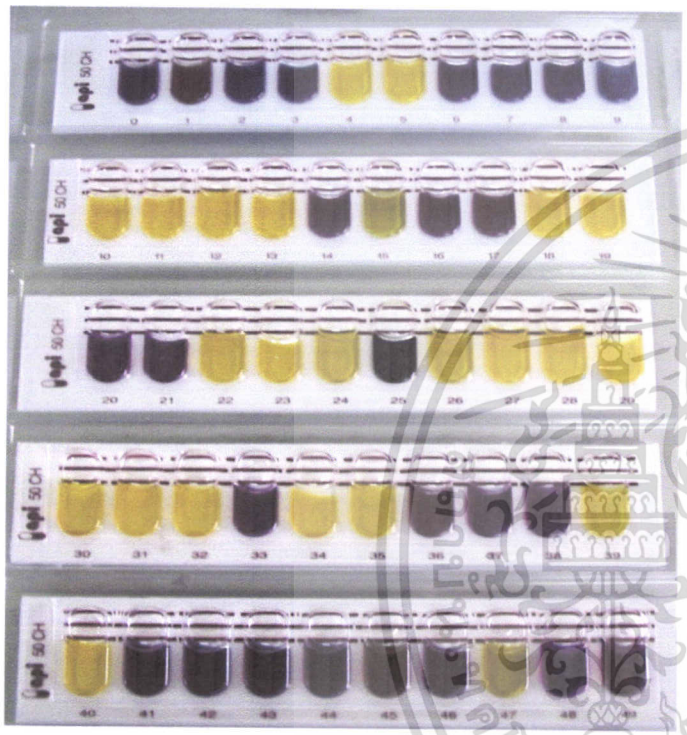
ภาพผลการทดลอง



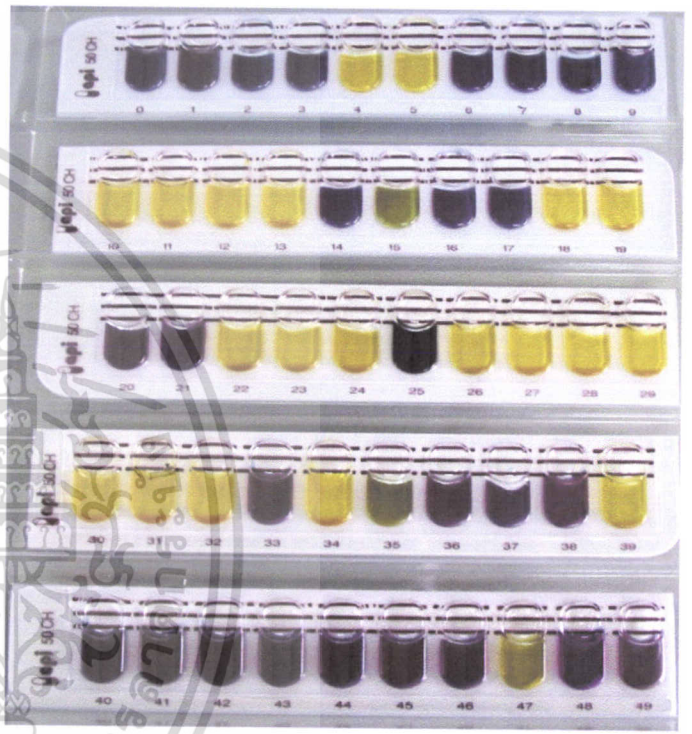
D 12

D 22

ภาพที่ 12 ผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียแลกติกหัส D 12 และ D 22 อาศัยการหมักน้ำตาลจำนวน 49 ชนิด ตาม API 50CH system บริษัท bioMérieux



D 49



N 11

ภาพที่ 13 ผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียแลกติกรหัส D 49 และ N 11 อาศัยการหมักน้ำตาลจำนวน 49 ชนิด ตาม API 50CH system บริษัท bioMérieux

ประวัติผู้เขียน

นางสาวปรนีย์ ศรีพินิจ
สาขาวิชา เทคโนโลยีการหมัก
โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนชลราษฎรอำรุง จ. ชลบุรี

นางสาวภัณธิรา เทศถนอม
สาขาวิชา เทคโนโลยีการหมัก
โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนคณะราษฎร์บำรุงปทุมธานี จ. ปทุมธานี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้