21408

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง
ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการจัดตั้งคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2549

การผลิตจุลินทรีย์โปรไบโอติก *Bacillus subtilis* ในกากถั่วเหลืองเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์

(Production of *Bacillus subtilis* as Probiotic feed in soybean meal)

โดย
1. น.ส. ชญานีย์ นันทิวัชรินทร์ รหัสนักศึกษา 46040138 สาขาวิชา อุตสาหกรรมเกษตร
2. น.ส. เบญจมาศ ทัศน์เจริญพร รหัสนักศึกษา 46040148 สาขาวิชา อุตสาหกรรมเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษา
รศ. ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

T096909

คณะกรรมการ
ดร. ศศิวิมล ชื่นอิ่ม

ลพ.
ส 113 ก
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 96909
วัน,เดือน,ปี 5 JUN 2550

.b 11278386
.i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น.ส. ชญานีย์ นันทิวัชรินทร์ และ น.ส. เบญจมาศ ทัศน์เจริญพร : เรื่อง การผลิตจุลินทรีย์โปร-ไบโอติก *Bacillus subtilis* ในกากถั่วเหลืองเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ (Production of *Bacillus subtilis* as Probiotic feed in soybean meal) ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาห-กรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

ในสภาวะปัจจุบันได้มีการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตจุลินทรีย์โปรไบโอติก *Bacillus subtilis* ในกากถั่วเหลืองเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยเริ่มจากการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการเจริญของสปอร์ของเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* spp. โดยเปรียบเทียบการเจริญของสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด คือ Nutrient Yeast Salt Medium (NYSM), Nutrient Broth (NB), Nutrient Broth + Salt solution (NB+SS) โดยทำการบ่มเชื้อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และทำการตรวจนับปริมาณสปอร์ทุก 6 ชั่วโมง พบว่า NB+SS มีแนวโน้มการเพิ่มจำนวนปริมาณสปอร์มากขึ้นที่สุด จึงได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB+SS บ่มทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปหมักกับกากถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งแล้ว ซึ่งมีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^5 log cfu /mL และทำการตรวจนับปริมาณสปอร์ในชั่วโมงที่ 16, 20 ของการหมัก โดยมีแนวโน้มการเพิ่มของปริมาณสปอร์มากที่สุดในชั่วโมงที่ 20 ของการหมักเท่ากับ 10^6 log cfu/mL จากนั้นจึงได้นำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการ หมักในชั่วโมงที่ 20ไปทำการอบแห้งที่ 50 °c เพื่อดูการเหลือรอดของสปอร์ในชั่วโมงที่ 10, 20 และ 30 พบว่าในชั่วโมงที่มีปริมาณสปอร์เพิ่มมากขึ้นที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญของการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* และเมื่อเปรียบเทียบวิธีการบ่มเชื้อ 2 วิธี โดยวิธีที่ 1 จะทำการเขี่ยเชื้อ 1 loop ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB+SS บ่มทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงในสภาวะเขย่า ส่วนวิธีที่ 2 จะทำการเขี่ยเชื้อ 1 loop ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB+SS บ่มทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ 1 mL ของเชื้อที่บ่มไว้มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB+SS แล้วบ่มในทิ้งไว้อีก24 ชั่วโมงในสภาวะเขย่าเช่นเดียวกับวิธีที่ 1 และทำการเปรียบเทียบ ปริมาณสปอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อทั้ง 2 วิธี พบว่า จะมีการผลิตสปอร์มากที่สุดในชั่วโมที่ 20 ของวิธีที่ 2 จึงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ ผลิตสปอร์ของ *Bacillus subtilis* มากที่สุด เมื่อนำกากถั่วเหลืองที่อบแห้งได้ไปทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อดูปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* เพื่อศึกษาระยะการเก็บรักษากากถั่วเหลืองอบแห้งนี้ ได้ทำการเก็บกากถั่วเหลืองแห้งไว้เป็นเวลา 1 เดือน แล้วนำมาตรวจปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* อีกครั้ง พบว่า ปริมาณสปอร์มีจำนวนลดลงเหลือ 10^5 log cfu/mL ซึ่งยังเป็นปริมาณที่มากพอ แสดงให้เห็นว่า ถ้านำกากถั่วเหลืองแห้งนี้ไปใช้เป็นอาหารสัตว์ก็จะสามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลา 1 เดือนเป็นอย่างต่ำ

.....

....

ลายมือนักศึกษา (อาจารย์ อดิศร เสวตวิวัฒน์) วัน เดือน ปี

ลายมือชื่ออาจารย์ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษเรื่อง การผลิตจุลินทรีย์โปรไบโอติก *Bacillus subtilis* ในกากถั่วเหลืองเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์เล่มนี้คงจะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงได้ถ้าปราศจากบุคคลรอบข้างทุกท่านที่สนับสนุนและท้วงติง ดิฉันถือว่าทุกท่านได้เป็นแรงผลักดันให้ดิฉันสามารถทำปัญหาพิเศษได้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษาและคำแนะนำมาโดยตลอดเวลา และขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่ถ่ายทอดวิชาความรู้และให้คำปรึกษา ขอขอบคุณ เพื่อนๆทุกคนที่คอยให้กำลังใจอยู่เสมอมา

ขอขอบพระคุณ พ่อ แม่ และทุกคนในครอบครัวที่ให้ความรักและกำลังใจแก่ดิฉันมาโดยตลอด

คณะผู้จัดทำ

24 มกราคม 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	2
2.1. กากถั่วเหลือง	2
2.2. ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากถั่วเหลือง	3
2.3. ความหมายของจุลินทรีย์โปรไบโอติก	4
2.4. ลักษณะของจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis*	4
2.5. สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ *Bacillus* spp.	5
2.6. อาหารเลี้ยงเชื้อสปอร์	5
2.7. แหล่งสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ	5
2.8. ส่วนผสมที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมในการสร้างสปอร์	6
2.9. Supplement ที่มีผลต่อการเจริญและสร้างสปอร์	7
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	8
3.1. สารเคมี	8
3.2. เครื่องมือใช้เตรียมวัตถุดิบ	8
3.3. วัตถุดิบ	9
3.4. ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	9
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์	12
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	19
เอกสารอ้างอิง	20
ภาคผนวก	
ก สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ	21
ข การคำนวณทางสถิติ	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 2.1 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของกากถั่วเหลือง 2
ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณกรดอะมิโนของกากถั่วเหลือง 3
ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อ B_1 ในหน่วย โคโลนี/mLใน
อาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน ที่ชั่วโมง 0, 6, 12, 18, 24 12
ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อ B_{43} ในหน่วย โคโลนี/mLใน
อาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน ที่ชั่วโมง 0, 6, 12, 18, 24 13
ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ในหน่วย โคโลนี/mLใน
อาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน ที่ชั่วโมง 0, 6, 12, 18, 24 13
ตารางที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด 14
ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อ B_1 ในหน่วย โคโลนี/mL ในกากถั่วเหลือง
ที่ผ่านการคลุกเชื้อที่ชั่วโมงที่ 0, 16 และ 20 15
ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ในหน่วย โคโลนี/mL ใน
กากถั่วเหลืองที่ผ่านการคลุกเชื้อที่ชั่วโมงที่ 0, 16 และ 20 16
ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ในหน่วย โคโลนี/mL
หลังทำการอบแห้งที่ชั่วโมง 0, 6, 12, 18, 24 17
ตารางที่ 4.8 แสดงปริมาณความชื้นของกากถั่วเหลืองที่มีการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis*
หลังอบแห้ง 18
ตารางที่ 4.9 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ในกากถั่วเหลืองอบแห้ง
ที่ผ่านการเก็บรักษาไว้ 1 เดือน 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูป	หน้า
รูปที่ 1 แสดงปริมาณเชื้อ B_1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิด	13
รูปที่ 2 แสดงปริมาณเชื้อ B_{43} ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิด	14
รูปที่ 3 แสดงปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิด	14
รูปที่ 4 กากถั่วเหลืองที่คลุกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* spp.	15
รูปที่ 5 แสดงปริมาณสปอร์ B_1 ในกากถั่วเหลืองในช่วงเวลาต่าง ๆ	16
รูปที่ 6 แสดงปริมาณสปอร์ *B. subtilis* ในกากถั่วเหลืองในช่วงเวลาต่าง ๆ	16
รูปที่ 7 แสดงปริมาณสปอร์ *B. subtilis* ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการอบแห้ง ในช่วงเวลาต่าง ๆ	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

ในสภาวะการณ์ปัจจุบันการทำอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ นิยมทำในรูปแบบไบโอฟาร์ม (Biofarm) ซึ่งจะเน้นทางด้านชีวภาพ ไม่ใช้ยาหรือสารเคมีที่จะมีผลตกค้างในตัวของสัตว์ อันจะมีผลกระทบมายังผู้บริโภค ทำให้โปรไบโอติกเข้ามามีบทบาทที่ใช้ในการเสริมในอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโค กระบือ สุกร ไก่ ซึ่งจะใช้ทดแทนสารปฏิชีวนะ ทำให้จุลินทรีย์โปรไบโอติกเข้ามามีบทบาทสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ที่นิยมใช้ในอาหารสัตว์ ซึ่งจะช่วยสร้างเอนไซม์โปรตีนเอสที่สามารถย่อยโปรตีนในอาหารได้ ทำให้สัตว์สามารถนำสารอาหารไปใช้ได้ง่ายขึ้น ด้วยเหตุนี้ผู้ทดลองจึงได้ทำการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* ที่อยู่ในรูปกากถั่วเหลืองอบแห้ง เพื่อที่จะได้ง่ายต่อการใช้งานในอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาถึงชนิดของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis*
2. เพื่อศึกษาถึงช่วงเวลาที่เหมาะสม ที่มีผลต่อการเจริญเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ในขณะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ
3. เพื่อศึกษาถึงช่วงเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการอบแห้งกากถั่วเหลือง ซึ่งมีผลต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1. กากถั่วเหลือง (Soybean meal)

กากถั่วเหลือง (Soybean meal) เป็นผลพลอยได้จากโรงงานสกัดน้ำมันถั่วเหลือง มี 2 ชนิด คือ กากถั่วเหลืองที่ได้จากขบวนการอัดน้ำมันและกากถั่วเหลืองที่ได้จากขบวนการสกัดน้ำมันด้วยสารเคมี

แหล่งโปรตีนจากพืชส่วนใหญ่ คือ กากของเมล็ดพืชน้ำมัน (Oil seeds) ที่ผ่านกระบวนการแยกน้ำมันออกไปแล้ว กากที่เหลือจะมีโปรตีนสูงขึ้น จึงนำมาเป็นแหล่งเสริมโปรตีนให้กับสัตว์ กากที่ได้จากการอัดน้ำมัน (Pressd meal) ได้จากกระบวนการบีบอัดให้น้ำมันออกมา (Mechanical extraction หรือ Pressing) กากจึงออกมาเป็นก้อน (Cake) นำกากไปบด (Grinding) บี้หรือทุบให้แตก (Crumble) ส่วนกากที่ได้จากการสกัดน้ำมัน (Solvent extraction) เป็นการใช้สารเคมีสกัด (Chemical cxtraction) จะออกมาเป็นแผ่นบาง (Flake) แล้วนำไปบดให้ละเอียดอีกครั้ง

ส่วนประกอบทางเคมีของกากถั่วเหลือง นับว่ายังมีคุณค่าทางอาหาร กล่าวคือ มีคุณภาพโปรตีนดี รองจากปลาป่นมี คือ โปรตีนประมาณ 42-48 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับขบวนการสกัดน้ำมัน มีไขมันอยู่ประมาณ 1-4 เปอร์เซ็นต์ มีระดับธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสต่ำ

ตารางที่ 2.1 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของกากถั่วเหลือง

ส่วนประกอบ	ปริมาณ(%)
ความชื้น	10
โปรตีน	44
ไขมัน	1
เยื่อใย	7.0
เถ้า	6.0
แคลเซียม	0.25
ฟอสฟอรัสใช้ประโยชน์ได้	0.20

ที่มา : http://www.dld.go.th/inform/ksoy.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณกรดอะมิโนของกากถั่วเหลือง

กรดอะมิโน	ปริมาณ(%)
ไลซีน	2.73
เมทไธโอนีน	0.59
เมทไธโอนีน + ซีสตีน	1.26
ทริปโตเฟน	0.59
ทรีโอนีน	1.72
ไอโซลูซีน	2.17
อาร์จินีน	3.18
ลูซีน	3.39
เฟนิลอะลานีน+ไทโรซีน	3.82
อิสติดีน	1.11
เวลีน	2.24
ไกลซีน	1.83

ที่มา : http://www.dld.go.th/inform/ksoy.html

ในกากถั่วเหลืองมีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินที่สำคัญ คือ Kunitz inhibitor ประมาณ 1.4 เปอร์เซ็นต์ และ Bowman-inhibitor ประมาณ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ชนิดและปฏิกิริยาของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินนี้จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของถั่วเหลือง (Frattali และ Steiner, 1968) แต่ถั่วเหลืองเกือบทุกสายพันธุ์จะพบ Kunitz inhibitor กากถั่วเหลืองที่ได้รับความร้อนไม่เพียงพอ โดยเฉพาะกากถั่วเหลืองอัดน้ำมันจะยังมีสารยับยั้งทริปซินหลงเหลืออยู่ในระดับสูง มีผลทำให้การย่อยได้ลดลง โดยเฉพาะในสัตว์เล็ก จะแสดงอาการโตช้าลง กากถั่วเหลืองที่ได้รับความร้อนเกินไป จะมีสีน้ำตาลคล้ำ มีกลิ่นเหม็นไหม้ทำให้การย่อยได้ของไลซีนลดลง ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะในสัตว์เล็ก

2.2. ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากถั่วเหลือง

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากถั่วเหลืองเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการยอมรับเป็นอย่างดีในประเทศไทย และประเทศแถบเอเชีย มีการพัฒนาเทคนิคการผลิต การผลิตเป็นอาหารหมักนั้นเป็นส่วนใหญ่เป็นขั้นตอนการทำงานของจุลินทรีย์ ซึ่งมีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา โดยอาจใช้เชื้อชนิดใดชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนึ่ง สองชนิด หรือทั้งสามชนิดก็ได้ ซึ่งชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ก็เป็นตัวกำหนดชนิดของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ต้องมีการควบคุมให้เป็นไปตามต้องการให้มีจุลินทรีย์ชนิดใดในผลิตภัณฑ์ และกำจัดจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการหรือจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษ จากการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ระยะหนึ่งก็จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสี กลิ่น รสเฉพาะ ปัจจุบันประเทศไทยมีการใช้ถั่วเหลืองเป็นอาหารหมักโดยเฉพาะในลักษณะที่เป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณถั่วเหลืองที่ผลิตได้ในประเทศ

คุณค่าทางโภชนาการของอาหารหมักจากถั่วเหลือง สารอาหารโปรตีนยังคงเป็นสารอาหารหลัก เนื่องจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งของโปรตีน ไขมัน แร่ธาตุ และวิตามิน แต่ชนิดของโปรตีนจะอยู่ในลักษณะที่ถูกย่อยแล้วเป็นขนดโมเลกุลที่เล็กลง นั่นคือ อยู่ในรูปของกรดอะมิโนมากขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์จากการทำงานของจุลินทรีย์ ปริมาณของกรดอะมิโนบางชนิด เช่น กลูตามิค จะทำให้รสชาติของผลิตภัณฑ์ดีขึ้น ขณะเดียวกันกรดไขมัน และน้ำตาลในถั่วเหลืองจะถูกย่อยสลาย และเปลี่ยนแปลงเป็นสารทำให้กลิ่นหอมสีเหลืองทองหรือสีน้ำตาล ผลจากการย่อยสารอาหารที่มีถั่วเหลือง โดยจุลินทรีย์จะทำให้สารอาหารส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่ถูกย่อยและดูดซึมได้ง่ายขึ้น และนอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์บางชนิดผลิตประเภทวิตามินเพิ่มขึ้นในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากถั่วเหลืองบางชนิดยังมีการเติมธัญพืช ซึ่งขาดไลซีน แต่มีเมทไธโอนีน และทริปโตเฟนเพียงพอในขณะที่ในถั่วมีไลซีนมาก แต่ขาดเมทไธโอนีน และทริปโตเฟน ดังนั้นเมื่อร่วมกันก็ทำให้ผลิตภัณฑ์นี้มีคุณค่าของโปรตีนสมบูรณ์เทียบเท่าเนื้อสัตว์ (อรอนงค์ , 2524)

2.3. ความหมายของจุลินทรีย์โปรไบโอติก

จุลินทรีย์โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ ที่เป็นตัวทำให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารอยู่ในสมดุล ซึ่งจะช่วยในการเจริญเติบโตของสัตว์ ช่วยลดจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคของสัตว์ จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่นิยมใช้อาหารสัตว์ก็คือ *Bacillus subtilis* ซึ่งจะสร้างเอนไซม์โปรตีนเอสที่สามารถย่อยโปรตีนในอาหารได้ ทำให้สัตว์สามารถนำโปรตีนในอาหารไปใช้ได้ง่ายขึ้น

2.4. ลักษณะของจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis*

B. subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ได้หลายชนิดและเจริญได้ดีในสูตรอาหารอย่างง่ายที่มีแหล่งกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน รวมถึงมีเกลือแอมโมเนียเป็นแหล่ง ไนโตรเจน เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เป็นอาหารแข็ง เช่น Nutrient broth (NB) และ Nutrient Agar (NA) โคโลนีจะแบน แห้ง และมีขนาดใหญ่ ลักษณะโคโลนีจะเปลี่ยนแปลงไปตามอายุ (Harwood และ Cutting, 1998) โคโลนีอาจกลมหรือไม่กลม ขอบไม่เรียบ ผิวนูน

เอกสารนี้ได้รับการสงวนลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สีขุ่น อาจมีลักษณะย่น สีครีมหรือน้ำตาล ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารแข็งที่ใช้เพาะเลี้ยง และจุลินทรีย์จะเจริญได้ดีเมื่ออาหารแข็งนั้นมีความชื้นเหมาะสม *B. subtilis* เริ่มสร้างเอนโดสปอร์ กว้าง 0.8 ไมโครเมตร ยาว 1.2-1.8 ไมโครเมตร ทำให้เอนโดสปอร์นี้จะมีคุณสมบัติที่ทนต่อสภาพต่างๆได้ดี เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะขาดแคลนอาหารหรือสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ความร้อน ความเย็น ความแห้ง หรือแม้แต่สารเคมีที่เป็นพิษต่อเซลล์

2.5. สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ *Bacillus* spp. (สิทธิสิน บวรสมบัติ, 2542)

1. สารอาหาร แบคทีเรียสกุล *Bacillus* เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีธาตุคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลัก เนื่องจากธาตุทั้งสองเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างที่สำคัญของเซลล์ จึงมีความต้องการในปริมาณสูงเมื่อเทียบกับธาตุอื่น ๆ
2. อุณหภูมิ แบคทีเรียสกุล *Bacillus* เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิกว้าง คือ -5 ถึง 70 องศา แต่ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง แต่บางสปีชีส์สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง
3. ออกซิเจน แบคทีเรียสกุล *Bacillus* จัดเป็นพวก aerobe และ facultative anaerobe จึงเจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจนหรือมีเพียงเล็กน้อย
4. พีเอช เหมือนกับแบคทีเรียทั่วไปที่เจริญได้ดีในพีเอชที่เป็นกลาง ประมาณ 6.8 – 7.2
5. ความชื้น *Bacillus* สามารถแบ่งตัวได้ดีในที่ที่มีค่า water activity สูง

2.6. อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium)

โดยทั่วไปเมื่อกล่าวถึงคำว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ จะหมายถึง สารประกอบใด ๆ ที่มีสารอาหาร แร่ธาตุ และสารอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ อาจรวมไปถึงวัตถุดิบจากธรรมชาติ (raw material) ที่จุลินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารหรือ substrates เพื่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งในห้องปฏิบัติการอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะต้องการสารอาหารแตกต่างกันออกไป จึงไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งที่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทุกชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7. แหล่งสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีดังนี้ (สิทธิสิน บวรสมบัติ, 2542)

1. แหล่งพลังงาน (energy source)นำไปสร้างพลังงานเพื่อการเจริญและกิจกรรมต่าง ๆ สารอาหารเหล่านี้ ได้แก่ กลูโคส ไขมัน หรือ เกลือแอมโมเนีย เป็นต้น

2. แหล่งคาร์บอน (carbon source) หมายถึง สารที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ นำไปสร้างเป็นส่วนประกอบของเซลล์ ส่วนที่เป็นธาตุคาร์บอน สารอาหารดังกล่าว ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส หรือ คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น

3. แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) หมายถึง สารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ นำไปสร้างเป็น ส่วนประกอบของเซลล์ที่เป็นไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโน, เกลือแอมโมเนีย เกลือไนเตรต เป็นต้น

4. แหล่งเกลือแร่ (mineral source) ได้แก่ ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม และเหล็กจุลินทรีย์ต้องการแร่ธาตุเหล่านี้สูงกว่าเกลือแร่อื่นๆ

ส่วนประกอบทางเคมีของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งของพลังงาน มักใช้สารประกอบเคมีหรือแสงเป็นแหล่งพลังงาน แหล่งของคาร์บอนเพื่อใช้สังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์ แหล่งไนโตรเจนส่วนประกอบในการสร้างโปรตีนและกรดนิวคลีอิก แหล่งซัลเฟอร์และฟอสเฟตใช้เพื่อสังเคราะห์กรดอะมิโน ส่วนฟอสเฟตใช้ในรูปของเกลือฟอสเฟตเพื่อสร้างกรดนิวคลีอิก ฟอสโฟ-ลิพิด แร่ธาตุจะทำหน้าที่เป็น โคแฟคเตอร์ (Cofactor) ช่วยในการทำงานของเอนไซม์บางตัว วิตามิน B1, B2, B6, กรดแพนโทเทนิก (panthothenic acid) และไบโอทิน น้ำเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ธาตุจะต้องอยู่ในรูปของสารละลายก่อนที่จะซึมเข้าไปในเซลล์และป้องกันการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

2.8. ส่วนผสมที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมในการสร้างสปอร์ (อุสุมา ฤทธิ์ภักดี, 2547)

การเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากจะขึ้นอยู่กับสภาพการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแล้วยังขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีส่วนผสมของอาหารที่มีคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งส่วนผสมที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่

1. เปบโตน เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน และสามารถละลายน้ำได้ มีกรดอะมิโนอิสระและสารประกอบไนโตรเจนที่ละลายน้ำได้ เช่น เปบไตด์ (peptides) และโปรตีโอส(proteose) แหล่งโปรตีนที่นิยมนำมาผลิต peptone ได้แก่ เนื้อสัตว์ เคซีน เจลาติน(gelatine) และถั่วเหลือง (soybean) การย่อยสลายโปรตีนอาจใช้กรดเกลือหรือเอนไซม์ เช่น trypsin หรือ pepsin โดยกรดอะมิโน peptides และ proteose จะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน คาร์บอนหรือทั้งสองอย่าง สารอาหารอื่น ๆ ที่มีใน peptone ได้แก่ วิตามิน เกลือแร่ พิวรีนและไพริมิดีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ยีสต์สกัด (yeast extract) สารสกัดจากยีสต์มีความเหมาะสมอย่างมาก เพราะ ใช้เป็นแหล่งของสารกลุ่มวิตามินบี และเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ สารอื่น ๆ ที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ พิวรีน ไพริมิดีน รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายโปรตีน เช่น กรดอะมิโน peptide และเกลือแร่

3. เนื้อวัวสกัด (beef extract) สกัดจากเนื้อที่ไม่มีไขมัน ประกอบด้วย กรดอะมิโนต่าง ๆ ครบถ้วน และสารที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต สารประกอบพวกไนโตรเจน และวิตามินที่ละลายน้ำได้ ซึ่ง beef extract นี้ จะช่วยกระตุ้นการเจริญของเชื้อ เนื่องจากมี growth factor และวิตามินชนิดต่าง ๆ

4. กลูโคส (glucose) เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ ซึ่งกลูโคสเป็นสารอาหารที่ จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ทันทีโดยไม่ต้องผลิตเอนไซม์มาย่อยสลาย การที่นิยมใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก เนื่องจาก กลูโคสจะถูกดูดซึมได้ง่ายและย่อยสลายให้พลังงานในรูปของสาร อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate, ATP) นอกจากนี้ยังพบว่ากลูโคสมีส่วนช่วยกระตุ้นให้เซลล์ที่อยู่ในระยะต้นของการสร้างสปอร์กลับมาสู่ระยะเจริญ และเพิ่มจำนวนได้อีก

2.9. Supplement ที่มีผลต่อการเจริญและสร้างสปอร์ (อุสุมา ฤทธิ์ภักดี, 2547)

นอกจากสารอาหารหลักที่ใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์แล้ว ในการสร้างสปอร์จะต้องมีการเพิ่มแร่ธาตุบางชนิด ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้จะช่วยส่งเสริมในการสร้างสปอร์ให้สารมารถเกิดได้ดีขึ้น ยกตัวอย่าง เช่น

1. $CaCl_2$ คลอไรด์ ใช้เป็นสารช่วยในการกระตุ้นให้การสร้างสปอร์เกิดได้เร็วขึ้น ซึ่งจะช่วยในระยะการกระตุ้นการสร้างของสปอร์ แคลเซียมช่วยในการทนความร้อนของสปอร์ ทำให้ผนังเซลล์แข็งและยังเป็นสารที่ใช้ในกระบวนการ metabolism ช่วยในการกระตุ้นสปอร์ที่อยู่ติดกันงอกได้เร็วขึ้น

2. $MnCl_2$ แมงกานีส และ คลอไรด์ ใช้เป็นสารช่วยในการกระตุ้นให้สปอร์งอกได้เร็วขึ้น

3. $MgSO_4$ แมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบของไรโบโซม DNA และเป็น cofactor ของเอนไซม์ ซัลเฟต ใช้เป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการ metabolism

4. $ZnSO_4$ สังกะสี ใช้เป็นสารช่วยในการกระตุ้นให้การสร้างสปอร์เกิดได้เร็วขึ้น ซัลเฟตใช้เป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการ metabolism

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1. สารเคมี

- น้ำกลั่น
- สาร์เจือจางตัวอย่าง (0.85 % NaCl)
- NA
- 2 N NaOH
- glucose
- peptone
- yeast extract
- beef extract
- $MgCl_2$
- $CaCl_2$
- $MnCl_2$

3.2. เครื่องมือใช้เตรียมวัตถุดิบ

3.2.1. เครื่องใช้

- ช้อนตักสาร
- Loop
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- อลูมิเนียมฟอยล์
- สำลี

3.2.2. เครื่องแก้ว

- บีกเกอร์ (Beaker)
- กระบอกตวง (Graduated cylinder)
- แท่งแก้วคน (Stirrer)
- ฟลาสก์ 250 ml
- หลอดทดลอง (Test tube)
- ปีเปต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- plate
- แท่งแก้วรูปตัวแอล
- Volume metric flask

3.2.3. อุปกรณ์ขนาดใหญ่

- เครื่อง shaker ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น RO5 Germany
- Hot air oven ยี่ห้อ memmert รุ่น U15 Germany
- Water baht ยี่ห้อ memmert รุ่น WV22 Germany
- Autoclave
- รังถึง
- เครื่องชั่งสาร

3.3. วัตถุดิบ

- กากถั่วเหลือง (ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทอุตสาหกรรมวิวัฒน์ [น้ำมันพืชทิพย์] จำกัด)
- เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus*
  - *B. subtilis* (ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทยูเนี่ยน แคสแทป จำกัด)
  - *Bacillus* spp. สายพันธุ์ B_1 (คัดได้จากแหล่งธรรมชาติ)
  - *Bacillus* spp. สายพันธุ์ B_{43} (คัดได้จากแหล่งธรรมชาติ)

3.4. ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

1. ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อในกลุ่ม *Bacillus*

1.1. การเลี้ยงเชื้อ

1.1.1. เขี่ยเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งได้จากบริษัทยูเนี่ยน แคสแทป จำกัด จำนวน 1 loop ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว NYSM 5 mL.บ่มทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง 18-24 ชม.

1.1.2 . ถ่ายกล้าเชื้อ 1 mL ลงในฟลาสก์ขนาด 250 mL จำนวน 3 ฟลาสก์ ที่มีอาหารเหลวต่างชนิดกัน คือ NYSM , NB, NB+SS 100 mL บรรจุอยู่ จากนั้นนำฟลาสก์ทั้ง 3 ไปบ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24 ชม. มาทำการตรวจนับหาปริมาณสปอร์ (ตามขั้นตอนที่ 1.2.)

1.1.3. ทำซ้ำโดยเปลี่ยนจาก *B. subtilis* ซึ่งได้จากบริษัทยูเนี่ยน แคสแทป จำกัด เป็นกลุ่ม *Bacillus* สายพันธุ์ B_1 และ B_{43} ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2. การตรวจนับหาปริมาณสปอร์

ทำการตรวจนับโดยวิธี spread plate technique โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังนี้

1.2.1. ดูดตัวอย่างจากฟลาสก์ทั้ง 3 จาก 1.1.2. ที่อยู่ในสภาวะเขย่าอย่างละ 5 mL ลงในหลอดทดลอง 3 หลอด จากนั้นนำหลอดทดลองทั้ง 3 ไปฆ่าเซลล์ที่มีชีวิตที่อุณหภูมิ 80 ^{0}C 15 นาที

1.2.2. เตรียมการเจือจางตัวอย่างเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งได้จากบริษัทยูเนี่ยน แคสแทป จำกัด ให้ได้ระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} ในสารละลาย NaCl 0.85 % ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.2.3. ใช้ปิเปตดูดเชื้อจาก 1.2.2 ที่เจือจางแล้ว 0.1 mL ลงบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ NYSM บนจานเลี้ยงเชื้อ

1.2.4. ใช้แท่งแก้วที่จุ่มด้วยแอลกอฮอล์ 95 % ลนไฟ รอจนแท่งแก้วเย็น นำไปกระจายเชื้อให้ทั่วที่ผิวหน้าของอาหาร โดยใช้มือหมุนจาน ทิ้งไว้ 5-10 นาที

1.2.5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{0}C 48 ชม. โดยทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำในแต่ละระดับความเจือจางที่ใช้

1.2.6. ทำการตรวจนับโคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ได้ในแต่ละระดับความเจือจางที่ทำ โดยหาค่าเฉลี่ยออกมา นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าจำนวนสปอร์ทั้งหมด ให้มีหน่วยเป็น cfu/mL โดย นำค่าเฉลี่ยของโคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อคูณด้วย 10 และคูณด้วยระดับความเจือจางเบื้องต้น

2. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *B. subtilis* ในกากถั่วเหลือง

2.1. การเตรียมกากถั่วเหลือง (วรินญา จารุทรรศน์พิมล และวิริยา นันทวุฒิกุล , 2545)

2.1.1. นำกากถั่วเหลืองมาปรับให้มีความชื้น 60- 65% โดยเติมน้ำในอัตราส่วน 1: 1 (w/v) คลุกให้เข้ากันดีแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

2.1.2. นำกากถั่วเหลืองจากข้างต้นปริมาณ 100 กรัม นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 ^{0}C เป็นเวลา 60 นาที

2.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ในกากถั่วเหลือง

2.2.1. เขี่ยเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งได้จากบริษัทยูเนี่ยน แคสแทป จำกัด จำนวน 1 loop ลงในฟลาสก์ขนาด 250 mL ที่มีอาหารเหลว NYSM , NB+SS 100 mL นำฟลาสก์ทั้ง 2 ไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ / นาที เป็นเวลา 24 ชม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2. นำเชื้อที่ผ่านการบ่มบนเครื่องเขย่าจากข้อ 2.2.1. มาคลุกกับการถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งแล้วจากข้อ 2.1.2. จากนั้นเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 16, 20 มาตรวจนับหาปริมาณสปอร์ ตามขั้นตอนที่ 1.2. และตรวจเช็คปริมาณความชื้นโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 120 ^{0}C 8 ชม.

2.2.3. ทำตามข้อ 2.2.1 และ ข้อ 2.2.2 โดยเปลี่ยนจากเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งได้จากบริษัทยูเนี่ยน แคสแทป จำกัด เป็นกลุ่ม *Bacillus* สายพันธุ์ B_1

3. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหลือรอดของสปอร์ *B. subtilis* ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการอบแห้ง

3.1. นำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการคลุกเชื้อ *B. subtilis* จากข้อ 2.2. ใน ชม.ที่มีปริมาณสปอร์ *B. subtilis* มากที่สุด ไปทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 ^{0}C และทำการสุ่มตัวอย่างตรวจเช็คหาปริมาณสปอร์ที่เหลือและปริมาณความชื้น ในชั่วโมงที่ 0, 10, 20 และ 30

3.2. วิธีที่ 2 เขี่ยเชื้อ *B. subtilis* จำนวน 1 loop ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว NYSM 5 mL. บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 18-24 ชม.

3.3. ปิเปต 1 mL. ของเชื้อที่ผ่านการบ่มในหลอดทดลองจาก 3.2. ลงในฟลาสก์ขนาด 250 mL ที่มีอาหารเหลว NB+SS 100 mL นำฟลาสก์ทั้ง 2 ไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

3.4. ทำการตรวจสอบปริมาณสปอร์ในวิธีที่ 2 ตามขั้นตอนเช่นเดียวกับ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์

4.1 ศึกษาถึงชนิดของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus*

จากการศึกษานี้เราเปรียบเทียบสารอาหาร คือ Nutrient Yeast Salt Medium (NYSM), Nutrient Broth (NB) และ Nutrient Broth + Salt Solution (NB+SS) กับการเจริญของเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ B_1 (ตารางที่ 4.1) , B_{43} (ตารางที่ 4.2) และ *B. subtilis* จากบริษัทยูเนี่ยน แคสแทป จำกัด (ตารางที่ 4.3) ที่เวลา 0, 6, 12, 18, และ 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างมาทำการตรวจนับหาปริมาณสปอร์ พบว่า การเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อในชั่วโมงที่ 0 ถึง 12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ยังไม่มีความแตกต่างกัน โดยสปอร์ของเชื้อยังมีปริมาณน้อย เมื่อถึงชั่วโมงที่ 18 การเจริญของเชื้อเริ่มมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น และมีการผลิตสปอร์เป็นจำนวนมากเมื่อเทียบกับชั่วโมงเริ่มต้นจนกระทั่งชั่วโมงที่ 24 จะพบว่า การเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกันและมีจำนวนเพิ่ม ขึ้นมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB+SS จะมีการเจริญของเชื้อและสร้างสปอร์เพิ่มขึ้นมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้ออีก 2 ชนิด (รูปที่ 1, 2, และ 3) โดยจากการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างปริมาณสปอร์ของเชื้อทั้ง 3 ชนิดกับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ปริมาณเชื้อทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อ B_1 ในหน่วย โคโลนี/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน ที่ชั่วโมง 0, 6, 12, 18, 24

ชนิดของอาหาร / เวลา(ชม.)	NYSM	NB	NB+SS
0	1.0×10^{3}	1.0×10^{3}	1.0×10^{3}
6	1.0×10^{3}	1.0×10^{3}	1.0×10^{3}
12	2.0×10^{3}	2.0×10^{3}	2.1×10^{3}
18	3.0×10^{4}	7.6×10^{4}	2.0×10^{4}
24	4.11×10^{5}	8.8×10^{5}	3.0×10^{6}

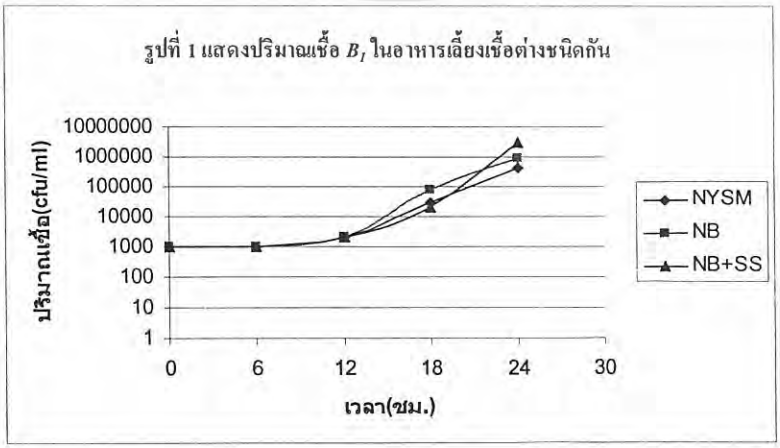
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อ B_{43} ในหน่วย โคโลนี/mLในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน ที่ชั่วโมง 0, 6, 12, 18, 24

ชนิดของอาหาร / เวลา(ชม.)	NYSM	NB	NB+SS
0	$2.0x\ 10^3$	$2.0x\ 10^3$	$2.48x10^3$
6	$3.9x\ 10^3$	$1.0x\ 10^3$	$1.0x\ 10^3$
12	$1.16x\ 10^4$	$3.2x\ 10^4$	$3.3x\ 10^4$
18	$3.5x10^4$	$9.3x\ 10^4$	$1.43x\ 10^5$
24	$5.5x\ 10^5$	$3.0x\ 10^5$	$3.0x\ 10^6$

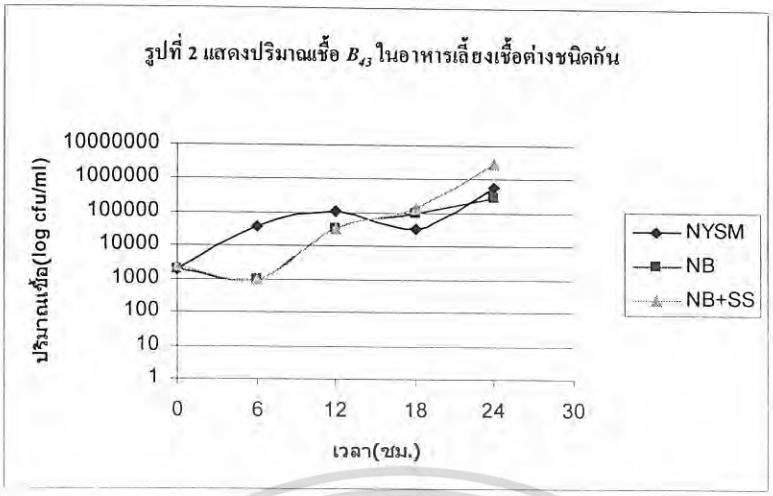
ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ในหน่วย โคโลนี/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน ที่ชั่วโมง 0, 6, 12, 18, 24

ชนิดของอาหาร / เวลา(ชม.)	NYSM	NB	NB+SS
0	$2.0x\ 10^3$	$1.0x\ 10^3$	$1.0x\ 10^3$
6	$2.0x\ 10^3$	$2.0x\ 10^3$	$2.0x\ 10^3$
12	$1.0x\ 10^3$	$1.0x\ 10^3$	$3.03x\ 10^3$
18	$4.1x\ 10^4$	$3.5x\ 10^4$	$8.5x\ 10^4$
24	$1.16x\ 10^5$	$3.55x\ 10^5$	$8.6x\ 10^5$

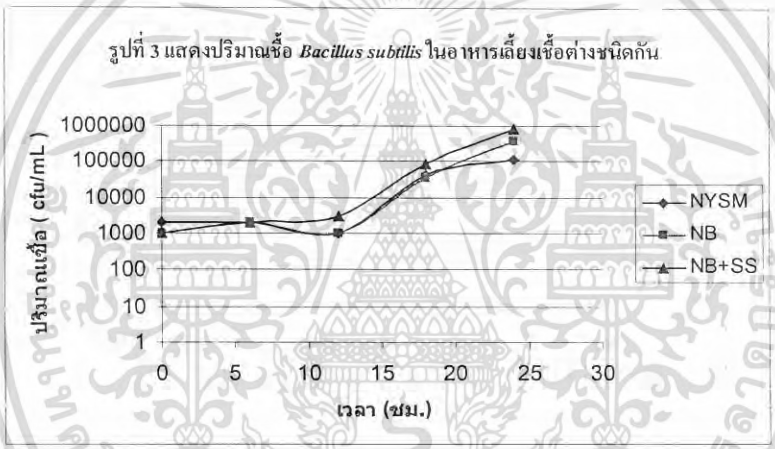


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2 แสดงปริมาณเชื้อ B_{43} ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน



รูปที่ 3 แสดงปริมาณเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน



เมื่อเปรียบเทียบ พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ NB+SS จะดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ NYSM และ NB ตามลำดับ ตามการทดลองของ Myers และ Yousten (1980) ซึ่งไม่เพียงแต่ช่วยในการสร้างสปอร์ในปริมาณที่มากแล้ว เมื่อเปรียบเทียบราคาอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ในประเทศไทย (ตารางที่4.4) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ NB+SS มีราคาที่ถูกกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ NYSM จึงได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NB+SS เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ NYSM ในการทดลองการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของสปอร์ในขั้นต่อไป

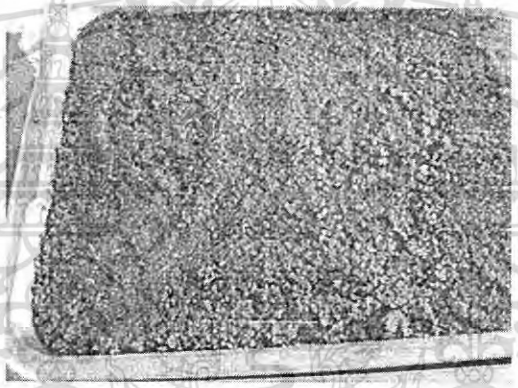
ตารางที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด

สูตรอาหาร	ราคา (บาทต่อลิตร)
NYSM	34.39
NB	31.10
NB+SS	31.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *B. subtilis* ในกากถั่วเหลือง

จากการศึกษาได้นำกากถั่วเหลืองที่นึ่งด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 ^{0}C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาคลุกกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ (รูปที่4) ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ คือ NB+SS และ NYSM โดยเปรียบเทียบปริมาณสปอร์ของเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* spp. สายพันธุ์ B_1 (ตารางที่ 4.5) และ *B.subtilis* จากบริษัทยูเนี่ยน แคสแทป จำกัด (ตารางที่ 4.6) ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิห้อง และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 16, 20 ชั่วโมง พบว่า เมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้นปริมาณสปอร์มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น (จากรูปที่ 5 และ 6) จากการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างปริมาณสปอร์กับระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มพบว่า ปริมาณสปอร์ ในช่วงเวลาทั้ง 3 (ชั่วโมงที่ 0, 16, 20) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยชั่วโมงที่ 20 มีแนวโน้มปริมาณสปอร์เพิ่มมากขึ้นที่สุด ดังนั้นจึงได้ใช้ชั่วโมงที่ 20 ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีปริมาณสปอร์เพิ่มมากที่สุดมาทำการอบแห้งในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 4 กากถั่วเหลืองที่คลุกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* spp.

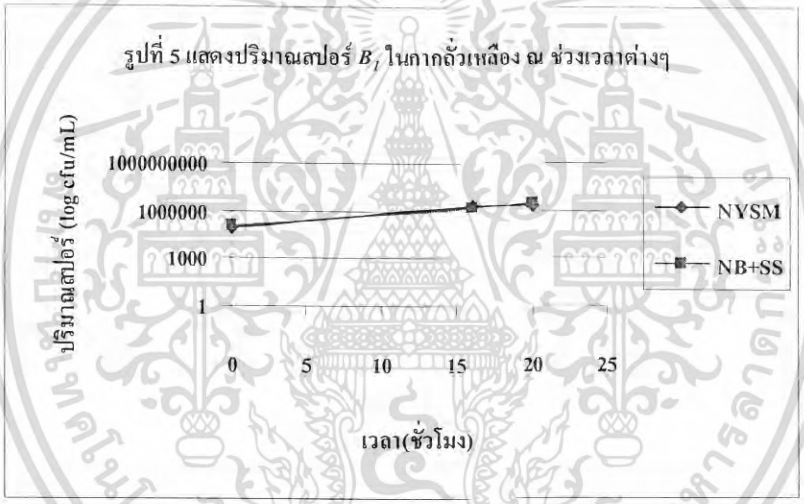
ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อ B_1 ในหน่วย โคโลนี/mL ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการคลุกเชื้อที่ชั่วโมงที่ 0, 16 และ 20

ชม.ที่	NYSM	NB+SS
	ปริมาณสปอร์เฉลี่ย	ปริมาณสปอร์เฉลี่ย
0	$9.71x10^4$	$1.25x10^5$
16	$1.93x10^6$	$1.76x10^6$
20	$2.07x10^6$	$3.0x10^6$

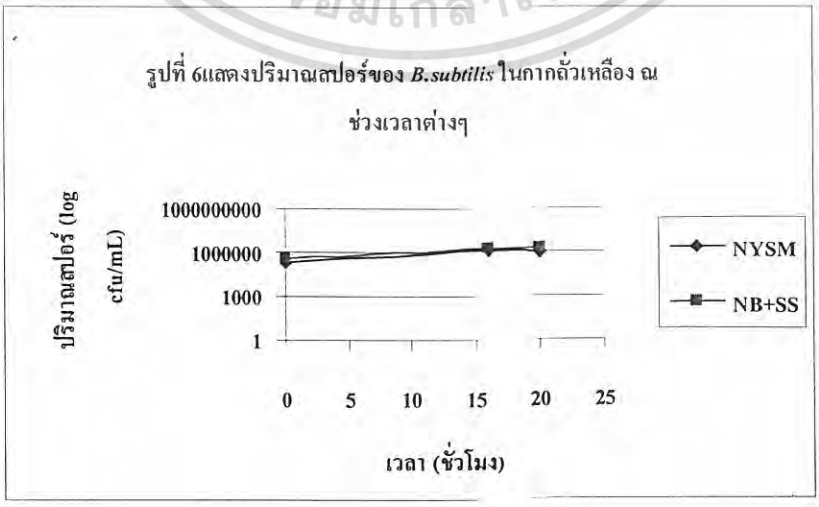
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B.subtilis* ในหน่วย โคโลนี/mL ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการคลุกเชื้อที่ชั่วโมงที่ 0, 16 และ 20

ชม.ที่	NYSM	NB+SS
	ปริมาณสปอร์เฉลี่ย	ปริมาณสปอร์เฉลี่ย
0	2.02×10^5	4.55×10^5
16	1.71×10^6	1.76×10^6
20	1.16×10^6	1.88×10^6



รูปที่ 5 แสดงปริมาณสปอร์ *B.* ในกากถั่วเหลือง ณ ช่วงเวลาต่างๆ



รูปที่ 6แสดงปริมาณสปอร์ของ *B.subtilis* ในกากถั่วเหลือง ณ ช่วงเวลาต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหลือรอดของสปอร์ *B. subtilis* ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการอบแห้ง

จากการศึกษาการเหลือรอดของปริมาณสปอร์ โดยเปรียบเทียบวิธีการบ่มโดยแบ่งออกเป็น 2 วิธี โดยวิธีแรกจะเขี่ยเชื้อจำนวน 1 loop ใส่ในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ NB+SS ไปบ่มบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปคลุกกับกากถั่วเหลืองที่นึ่งด้วยความร้อน วิธีที่ 2 จะเขี่ยเชื้อจำนวน 1 loop ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ NB+SS บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน ฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ NB+SS ไปบ่มบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปคลุกกับกากถั่วเหลืองที่นึ่งด้วยความร้อน จากนั้นนำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการคลุกเชื้อ *B.subtilis* ในชั่วโมงที่ 20 ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมในการสร้างสปอร์ ไปทำการอบแห้งที่อุณหภูมิที่ 50 ^{0}C และทำการเก็บตัวอย่างตรวจนับปริมาณสปอร์ที่เหลือ พบว่า วิธีที่ 1 เมื่อระยะเวลาการอบแห้งเพิ่มมากขึ้น ปริมาณสปอร์ที่เหลือรอดจะมีแนวโน้มลดลง ส่วนวิธีที่ 2 เมื่อทำการอบแห้งผ่านไปเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ปริมาณสปอร์มีจำนวนลดลงจากเริ่มต้น ผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 20 พบว่ามีปริมาณสปอร์เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่อุณหภูมิและเวลาดังกล่าวมีความเหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 30ปริมาณสปอร์กลับมีจำนวนลดลง (รูปที่ 6)

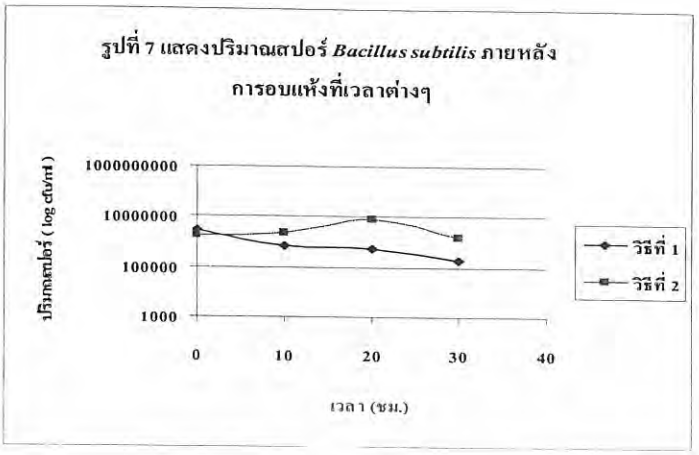
จากการเปรียบเทียบวิธีการเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 วิธี ในวิธีที่ 1 จะใช้ระยะเวลาในการบ่มเชื้อน้อยกว่าวิธีที่ 2 แต่จากการทดลอง พบว่า วิธีที่ 2 เนื่องจากมีปริมาณสปอร์ที่เหลือรอดชีวิตมากกว่าวิธีที่ 1 และปริมาณสปอร์ที่เหลือรอดในวิธีที่ 2 มีมากที่สุด ดังนั้น การอบแห้งกากถั่วเหลืองที่มีส่วนผสมสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่ได้จากบริษัทยูเนี่ยน แคสแทป จำกัด ที่ 50 ^{0}C ในเวลา 20 ชม. ของวิธีที่ 2 จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปเผยแพร่แนะนำให้ผู้ผลิตอาหารสัตว์ไปใช้ในการผลิตต่อไป (ดังตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ในหน่วย โคโลนี/mL หลังทำการอบแห้งที่ชั่วโมง 0, 6, 12, 18, 24

ชั่วโมงที่	วิธีที่ 1			วิธีที่ 2		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	$7.05x10^{5}$	$4.90x10^{6}$	$2.80x10^{6}$	$2.26x10^{6}$	$1.25x10^{6}$	$1.75x10^{6}$
10	$6.25x10^{5}$	$7.70x10^{5}$	$6.97x10^{5}$	$2.07x10^{6}$	$2.68x10^{6}$	$2.37x10^{6}$
20	$2.40x10^{5}$	$9.35x10^{5}$	$5.87x10^{5}$	$8.09x10^{6}$	$7.82x10^{6}$	$7.95x10^{6}$
30	$2.00x10^{5}$	$1.73x10^{5}$	$1.86x10^{5}$	$1.13x10^{6}$	$2.26x10^{6}$	$1.69x10^{6}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96909



ตารางที่ 4.8 แสดงปริมาณความชื้นของกากถั่วเหลืองที่มีการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* หลังอบแห้ง

ครั้งที่ 1

ชั่วโมงที่	วิธีที่	% ความชื้น (wet basis)
0	1	62.38
	2	64.63
16	1	38.32
	2	24.74
20	1	4.81
	2	4.35
30	1	4.48
	2	3.50

ครั้งที่ 2

ชั่วโมงที่	วิธีที่	% ความชื้น (wet basis)
0	1	62.07
	2	62.13
16	1	51.72
	2	34.91
20	1	11.18
	2	5.60
30	1	1.60
	2	1.59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การผลิตจุลินทรีย์โปรไบโอติก *Bacillus subtilis* ในกากถั่วเหลืองเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ ของการศึกษานี้มุ่งเน้นศึกษาถึงชนิดของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* (*B. subtilis* ,B_1และ B_{43}) โดยเปรียบเทียบปริมาณสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด คือ NYSM, NB, NB+SS จากการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง พบว่า การสร้างสปอร์ของเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* มีแนวโน้มเพิ่มจำนวนมากขึ้น โดยการเจริญของปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จึงสามารถเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดก็ได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบราคา NB+SS จะมีราคาถูกและการสร้างสปอร์ของเชื้อทั้ง 3 ชนิดมีการเจริญเป็นจำนวนมาก จึงเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมมากที่สุด

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *B. subtilis* โดยทำการคลุกเชื้อในกากถั่วเหลืองที่ให้ความร้อนแบบนึ่ง โดยทำการตรวจนับปริมาณสปอร์ที่เชื้อสามารถผลิตได้ในช่วงการบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 ^{0}c) เป็นเวลา 16 และ 20 ชั่วโมง พบว่า เมื่อบ่มเชื้อในกากถั่วเหลืองผ่านไป 20 ชั่วโมงปริมาณสปอร์ของเชื้อจะมีปริมาณเพิ่มมากที่สุด

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหลือรอดของสปอร์ *B. subtilis* ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการอบแห้งที่ 50 ^{0}c โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 วิธี วิธีที่ 1 จะทำการเขี่ยเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB+SS บ่มทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงในสภาวะเขย่า ส่วนวิธีที่ 2 จะทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB+SS บ่มทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มในทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงในสภาวะเขย่าเช่นเดียวกับวิธีที่ 1 และทำการเปรียบเทียบปริมาณสปอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อทั้ง 2 วิธี พบว่า ในแต่ละช่วงเวลาของวิธีที่ 2 ปริมาณสปอร์มีจำนวนลดลงจากเริ่มต้น ผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 20 พบว่า มีปริมาณสปอร์เพิ่มขึ้นมากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่อุณหภูมิและเวลาดังกล่าวมีความเหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ดังนั้นจึงเลือกใช้ชั่วโมงที่ ท 20 ท เนื่องจากมีปริมาณสปอร์ที่เหลือรอดชีวิตมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

" กากถั่วเหลือง " [Online] available : http://www.dld.go.th/inform/ksoy.html

วรินญา จารุทรรศน์พิมล และวิริยา นันทวุฒิกุล. 2545. เอกสารเสริมปัญหาพิเศษในหัวข้อเรื่องการผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติกจากกากถั่วเหลือง. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สิทธิสัน บวรสมบัติ. 2542. จุลชีววิทยาในอุตสาหกรรม. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ศุภชัย บุญนำมา. 2543. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต *Bacillus subtilis* ในอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2524. ผลิตภัณฑ์พืชตระกูลถั่ว. วิทยาศาสตร์การอาหาร 13(1) หน้า 14-25

อุสุมา ฤทธิ์ภักดี. 2547. โครงงานเทคโนโลยีชีวภาพ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Dregval, O.A., Cherevach, N.V., Vinnikov, A.I., 2002. The effect of a soil extract on the Development of *Bacillus thuringiensis* and on its systhesis of an insecticidal endotoxin. Microbiol.61 : 40-44

Frattali,V. and Steiner, R.F. 1968. Soybean inhibitors. I. Seperation and properties of three inhibitors from commercial crude soybean trypsin inhibitor. Biochemistry 7:521-530.

Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animal . A review. J. Appl. Bacteriol., 66 , 365-378.

Harwood , C.R. and Cutting , S.M., 1998. Sporulation, Germination and Outgrowth. Journal of Molecular Biological Methods of *Bacillus* : 391-395.

Kay , D. and Warren , S.C. 1998. Sporulation of *Bacillus*. Journal of Biochemistry . 109 : 819-829 .

Myers, P.S. and Yousten, A., 1980. Localization of a mosquito-larval toxin of *Bacillus sphaericus* 1593. Appl. Environ. Micro.39,1205-1209.

Nickerson , K.W. and Bulla , L.A.. 2004. Physiology of spore forming bacteria associated with insect ; minimal nutritional requirements for growth sporulation and parasporal crystal formation. Microbiol.28 : 127-128

Prabakaran , G. and Balaraman , K., 2005. Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* . Biological control . 36 : 288-292

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

1. NYSM (conventional medium)

Glucose	10	g.
Peptone	5.0	g.
Yeast extract	0.5	g.
Beef extract	3.0	g.
NaCl	5	g.
Salt Solution*	10	mL.
($MgCl_2$ 20.3 g/l , $CaCl_2$ 10.2 g/l $MnCl_2$ 1.0 g/l)		
น้ำกลั่น	1,000	ml.

2. Nutrients broth (NB)

Beef extract	3.0	g.
Peptone	5.0	g.
น้ำกลั่น	1,000	ml.

3. Nutrients broth with Salt Solution (NB+SS)

Beef extract	3.0	g.
Peptone	5.0	g.
Salt Solution	10	mL.
น้ำกลั่น	1,000	ml.

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดคือ NYSM, NB และNB+SS ตามสูตรอาหาร และปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ให้ได้ pH 7.0 ด้วย 2N NaOH จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับ pH แล้วไปทำการฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ^{0}C 15 นาท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การคำนวณทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข1 แสดงการคำนวณทางสถิติของปริมาณสปอร์ของเชื้อ B_1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

MEDIA		N	Subset for alpha = .05
			1
Duncan	NYSM	5	3.4784
	NB+SS	5	3.8201
	NB	5	4.0253
	Sig.		.512

ตารางที่ ข2 แสดงการคำนวณทางสถิติของปริมาณสปอร์ของเชื้อ B_{43} ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

MEDIA		N	Subset for alpha = .05
			1
Duncan	NB	5	4.2504
	NYSM	5	4.5093
	NB+SS	5	4.6284
	Sig.		.609

ตารางที่ ข3 แสดงการคำนวณทางสถิติของปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

MEDIA		N	Subset for alpha = .05
			1
Duncan	NYSM	5	3.8560
	NB	5	3.8791
	NB+SS	5	4.1293
	Sig.		.718

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

ตารางที่ ข4 แสดงการคำนวณทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณสปอร์ของเชื้อ B_1 ในแต่ละช่วงเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Corrected Model	5.976	3	1.992	21.829	.000
Intercept	615.890	1	615.890	6749.110	.000
MEDIA	9.778E-02	1	9.778E-02	1.071	.318
TIME	5.878	2	2.939	32.207	.000
Error	1.278	14	9.126E-02		
Total	623.144	18			
Corrected Total	7.254	17			

a R Squared = .824 (Adjusted R Squared = .786)

TIME	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	5.042	.123	4.777	5.306
16	6.226	.123	5.961	6.490
20	6.281	.123	6.016	6.545

ตารางที่ ข5 แสดงการคำนวณทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ในแต่ละช่วงเวลา

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.627	3	.542	9.268	.001
Intercept	620.129	1	620.129	10600.369	.000
TIME	1.460	2	.730	12.482	.001
MEDIA	.166	1	.166	2.841	.114
Error	.819	14	5.850E-02		
Total	622.575	18			
Corrected Total	2.446	17			

a R Squared = .665 (Adjusted R Squared = .593)

TIME	Mean	Std. Error	95%Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0	5.467	.099	5.255	5.679
16	6.055	.099	5.843	6.267
20	6.086	.099	5.875	6.298

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้