การเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อที่ผลิต ไนซิน (*Lactococcus lactis* P2) จากอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ

Growth and Bacteriocin Production by nisin producer (*Lactococcus lactis* P2) under various sugar media

วริศรา จูติมูสิก

ศรัญญา จันสมุทร

ศรัญญา ตงประเสริฐ

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อที่ผลิต ไนซิน (*Lactococcus lactis* P2) จากอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ

Growth and Bacteriocin Production by nisin producer (*Lactococcus lactis* P2) under various sugar media

จัดทำโดย

วริศรา จูติมูสิก รหัสนักศึกษา 59080114

ศรัญญา จันสมุทร รหัสนักศึกษา 59080115

ศรัญญา ตงประเสริฐ รหัสนักศึกษา 59080116

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

10/ส.ค./2563

(อาจารย์ รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การเจริญและการผลิตแบคเทโอริซินของเชื้อที่ผลิต ไนซิน (*Lactococcus lactis* P2) จากอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ
ชื่อนักศึกษา	วริศรา จูติมูสิก รหัสนักศึกษา 59080114
	ศรัญญา จันสมุทร รหัสนักศึกษา 59080115
	ศรัญญา ตงประเสริฐ รหัสนักศึกษา 59080116
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

การศึกษาการเจริญ และ สร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* (P2) โดยการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆแทนการใช้น้ำตาลกลูโคส มีอาหารเหลวสูตรมาตรฐาน de Man-Rogosa-Sharpe broth (MRS broth) เป็นอาหารควบคุม ด้วยการใช้อาหารเหลว Glucose Yeast Peptone (GYP) broth เป็นอาหารสำหรับปรับสูตรน้ำตาล โดยนำตาลที่ใช้ในการศึกษาจะมี น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง และกากน้ำตาล ทดแทนน้ำตาลกลูโคส ในสูตรอาหารเหลว GYP ทำการทดสอบโดยการเลี้ยง *Lc*.P2 ในอาหารเหลวสูตรน้ำตาล 4 ชนิด และ MRS broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับสูตรน้ำตาลที่ใช้ทดแทนกลูโคส (GYP) เป็น Sugar Yeast Peptone (SYP) broth, Raw Yeast Peptone (RYP) broth และ Molasses Yeast Peptone (MYP) broth ให้มีปริมาณน้ำตาลเป็น 2,4 และ 6 % เปรียบเทียบกับ MRS broth และ GYP broth สูตรมาตฐาน ที่มีการเจริญทดแทนปริมาณ 4 % ทุกชนิดจะทำให้การเจริญของเชื้อ P2 มากที่สุด กล่าวคือ RYP broth 4 % มีการเจริญที่ดีที่สุดคือมีปริมาณเท่ากับ $5.1x10^9$ CFU/ml, ในขณะที่อาหารปรับสูตร MYP broth 4 % มีการเจริญเท่ากับ $3.1x10^9$ CFU/ml, และในอาหารปรับสูตร SYP broth 4 % มีการเจริญเท่ากับ $2.4x10^9$ CFU/ml, เมื่อเทียบกับ MRS broth มีการเจริญเท่ากับ $2.0x10^9$ CFU/ml, ตามลำดับ โดยที่ GYP broth มีการเจริญเท่ากับ $1.0x10^8$ CFU/ml, ในการศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินโดยใช้ *Listeria innocua* ศึกษาดูความเข้มข้นของแบคเทอรโอซินที่ P2 ผลิตพบว่าอาหารเหลวสูตร RYP broth 4 % มีการสร้างแบคเทอริโอซินได้สูงสุดเท่ากับ 12,800 AU/ml, ในขณะที่อาหารปรับสูตร MYP broth 4 % มีการสร้างแบคเทอริโอซินเท่ากับ 6,400 AU/ml, และในอาหารปรับสูตร SYP broth 4 % มีการสร้างแบคเทอริโอซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 3,200 AU/ml, เมื่อเทียบกับอาหาร MRS broth ที่มีการสร้างแบคเทอริโอซินเท่ากับ 12,800 AU/ml, ตามลำดับ โดยที่ GYP broth มีการสร้างแบคเทอริโอซินเท่ากับ 200 AU/ml, จากข้อมูลข้างต้น สามารถสรุปได้ว่า ในอาหารเหลวสูตร RYP broth สามารถเจริญ และสร้างแบคเทอริโอซินได้สูงสุด จึงนำมาใช้ในการหาความเข้มข้นของ ไนซิน โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วย XAD 16 แสดงค่าความเข้มข้นของ ไนซิน ก่อนทำให้เข้มข้นเท่ากับ 12,800 AU/ml, และหลังจากทำให้เข้มข้นเท่ากับ 104,857,600 AU/ml, จึงกล่าวได้ว่า การใช้อาหารเหลวสูตร RYP broth มีประสิทธิภาพเทียบเท่าการใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารเหลว GYP broth อีกทั้งยังสามารถลดต้นทุนการผลิต และสามารถพัฒนาสูตรอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติคให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title Growth and Bacteriocin Production by nisin producer (*Lactococcus lactis* P2) under various sugar media

Student name	Warissara	Jutimoosik	Student ID 59080114
	Saranya	Jansamutr	Student ID 59080115
	Saranya	Tongprasert	Student ID 59080116

Program Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology

Year 2019

Advisor Asst. Prof.Dr. Adisorn Swetwiwathana

ABSTRACT

This sturdy is aimed to investigate the growth and bacteriocin production of lactic acid bacteria strain *Lactococcus lactis* P2 using different types of sugar instead of glucose, Glucose Yeast Peptone (GYP) broth is the basic medium for the study and glucose in this medium was substitute by using refined sugar, brown sugar and molasses (2,4 and 6 % of sugar concentration) Then the growth and bacteriocin production under each 4 sugar medium was studied and compared to control broth using MRS broth. All studied media were incubated at 30 °C for 18 hours. The results informed that at 4 % of each sugar substituted medium implied the highest growth of strain P2. We found that strain P2 in RYP broth gave the highest number of growth in RYP broth (4 % of raw sugar) upto 5.1×10^9 CFU/ml, while the growth of strain P2 in MYP broth (4 % of molasses sugar), SYP broth(4 % of refined sugar) and in control broth of MRS were 3.1×10^9, 2.4×10^9, and 2.0×10^9 CFU/ml, respectively. Meanwhile, the growth of P2 in GYP broth was 1.0×10^8 CFU/ml. The Bacteriocin production under the same of growth condition by using was studied by using *Listeria innocua* as a microbial indicator. The study also informed that at 4 % of each sugar substituted medium implied the highest bacteriocin production of strain P2. We found that strain P2 in RYP broth gave the highest number of bacteriocin production in RYP broth (4 % of raw sugar) upto 12,800 AU/ml, while the bacteriocin production of strain P2 in MYP broth (4 % of molasses sugar), SYP broth(4 % of refined sugar) and in control broth of MRS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

were 6,400 , 3,200 and 12,800 AU/ml, respectively. Meanwhile, the bacteriocin production of P2 in GYP broth was 200 AU/ml. From the above data, it can be concluded that in RYP broth formulations were able to grow and produce the highest bacteriocin levels. Therefore, it was used to find the concentration of nisin by using the XAD 16 technique. by the volume in 1,000 ml. The concentration before evaporation is 12,800 AU/ml, and after evaporation equal to 104,857,600 AU/ml. Thus, we conclude that glucose in GYP broth can be substituted with raw sugar in the formula of RYP broth. This new RYP broth led the same growth as using GYP broth. Moreover, the price of this RYP broth implied the lower price than GYP broth.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาจากท่านอาจารย์ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ที่ได้ให้คำเสนอแนะในด้านการศึกษาหัวข้อที่สนใจในปัญหาพิเศษ ช่องทางการศึกษาค้นคว้า การนำข้อมูลมาใช้อย่างถูกต้องและได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ ให้คำแนะนำในด้านวิธีในการปฏิบัติการทดลองอย่างถูกต้องเหมาะสมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือ และให้คำแนะนำในการแก้ปัญหาในกระบวนการทดลอง ทำให้ผู้ศึกษาสามารถศึกษาตามแผนการทดลองได้อย่างถูกต้องและครบถ้วน ตลอดจนให้คำแนะนำในการเขียนงานวิจัยที่สมบูรณ์ คณะผู้ศึกษาจึงขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบปัญหาพิเศษในครั้งนี้ และได้ให้คำแนะนำเพื่อปรับปรุงแก้ไขให้พัฒนาให้ดียิ่งขึ้น

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีเพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณบริษัท มิตรผล จำกัด ที่ได้สนับสนุนทุนวิจิจัยในการศึกษาปัญหาพิเศษฉบับนี้

และสุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ พี่ น้อง และเพื่อนๆ ที่ได้ให้การสนับสนุนในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้จนสำเร็จสมบูรณ์

วริศรา จูติมูสิก

ศรัญญา จันสมุทร

ศรัญญา ตงประเสริฐ

(19 เมษายยน 2562)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1	1
บทนำ	1
1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4. ขอบเขตการวิจัย	3
บทที่2	4
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1. *Lactococcus lactis*	4
2.2. แบคเทอริโอซิน (bacteriocin)	5
2.3. ไนซิน (Nisin)	6
2.4. น้ำตาลทราย (Sucrose)	7
2.5. น้ำตาลทรายดิบ (Raw sugar)	7
2.6. กากน้ำตาล (Molasses)	8
2.7. กลูโคส (Glucose)	9
2.8. วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบจุด (spot inoculate)	10
2.9. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในอาหารเหลวด้วยวิธี Spot on lawn method	11
2.10. amberlite xad-16 bead resins	11
2.11. Ion-exchange chromatography	12
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	14
3.1. เชื้อจุลินทรีย์	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 14

3.3. อุปกรณ์ 15

3.4. เครื่องมือ 16

3.5. ขั้นตอนและวิธีการทดลอง 17

บทที่ 4 ผลการทดลอง 22

4.1. ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Lactococcus Lactis* P2 และ เชื้ออินดิเคเตอร์ *Listeria innocua* 23

4.2. ผลการศึกษาค่าของแข็งที่ละลายน้ำ (%˚Brix ของน้ำตาลกลูโคส) 23

4.3. ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อและการสร้างแบคเทอริโอซินในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ 24

4.4. การศึกษาการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติก ประเมิลจากค่า pH 30

4.5. การศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซิน จาก ไนซิน ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก โดยใช้ XAD 16 31

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ 32

5.1. สรุปผล 32

5.2. ข้อเสนอแนะ 33

บรรณานุกรม 34

ภาคผนวก 37

ภาคผนวก ก. การสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลคติก Lactococcus lactis (P2) 38

ภาคผนวก ข. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 42

ประวัติผู้เขียน 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.2.1. ค่าของของแข็งที่ละลาย (%˚Brix ของน้ำตาลกลูโคส) ของสารละลายอาหารมาตรฐานของน้ำตาล 23

ตารางที่ 4.5.1. การศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซิน จาก ไนซิน ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก โดยใช้ XAD 16 ในการสกัด ไนซิน และทำให้เข้มข้น 31

ตารางที่ ก.3. ตารางแสดงภาพการทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินโดยใช้ Listeria innocua เป็นจุลินทรีย์ Indicator 39

ตารางที่ ก.4. ตารางแสดงภาพการทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินโดยใช้ Listeria innocua เป็นจุลินทรีย์ Indicator โดยใช้การสกัดด้วย XAD 16 41

ตารางที่ ข.3. ตารางสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose Yeast peptone (GYP broth) 43

ตารางที่ ข.4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA broth) (Difco, BBL/USA) 43

ตารางที่ ข.5. ตารางสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Sucrose Yeast peptone (SYP broth) 44

ตารางที่ ข.6. ตารางสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Raw sugar Yeast peptone (RYP broth) 44

ตารางที่ ข.7. ตารางสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Molasses Yeast peptone (MYP broth) 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1. Lactococcus lactis 5
รูปที่ 2.2. แผนภาพแสดงการสร้าง การตัด และการส่งแบคทีริโอซินออกนอกเซลล์ผู้สร้าง 6
รูปที่ 2.3. ไนซิน (Nisin) 7
รูปที่ 2.4. น้ำตาลทราย (Sucrose) 7
รูปที่ 2.5. น้ำตาลทรายดิบ (Raw sugar) 8
รูปที่ 2.6. กากน้ำตาล(Molasses) 9
รูปที่ 2.7. กลูโคส (Glucose) 9
รูปที่ 2.8. วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบจุด (spot inoculate) 10
รูปที่ 2.9. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ทดสอบในอาหารเหลวด้วยวิธี Spot on lawn method 11
รูปที่ 2.10. การแยกสารโดยใช้เรซินที่เอิบชุ่มด้วยตัวสกัด (solvent impregnated resin) 12
รูปที่ 2.11. การแลกเปลี่ยนไอออนโครมาโตกราฟี (Ion-exchange chromatography) 13
รูปที่ 4.1.1. ลักษณะทางกายภาพของเชื้อ Lactococcus Lactis P2 จากกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 1000 X 22
รูปที่ 4.1.2. ลักษณะทางกายภาพของเชื้ออินดิเคเตอร์ Listeria innocua จากกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 1000 X 22
รูปที่ 4.3.3. ผลการทดลองการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium 29
รูปที่ 4.3.4. ผลการทดลองการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RYP medium 4.0 % ของอาหาร 29
รูปที่ ก.1. ภาพการทดสอบเพื่อคัดเลือกสายพันธ์แบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติก เพื่อใช้ในการศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินโดยใช้ Listeria innocua เป็นจุลินทรีย์ Indicator 38
รูปที่ ก.2. ภาพการเจริญของแบคทีเรียแลคติก Lactococcus lactis (P2) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบปรับสูตรน้ำตาล RYP medium 4 % น้ำตาลทรายดิบ 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โดยปกติในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกจะนิยมใช้อาหาร MRS medium เพื่อใช้ในการเจริญและศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซิน ซึ่งอาหารชนิดดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นอาหารนำเข้าจึงมีราคาค่อนข้างสูง ในขณะที่มีผู้วิจัยบางท่าน มีการศึกษาการนำวัตถุดิบหรือผลพลอยได้ทางการเกษตร ที่ได้จากกระบวนการผลิตซึ่งยังคงมีสารอาหารอยู่มาใช้ประโยชน์ ซึ่งมีผู้วิจัยนำน้ำเวย์ ที่เหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง น้ำมะพร้าวจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำกะทิ และกากมะเขือเทศที่เหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตซอสมะเขือเทศ มาใช้ในการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก โดยใช้ร่วมกับสูตรอาหารมาตรฐาน GYP และ MRS (ศตพร กันแก้ว.2549)

มีการศึกษาในเรื่องการเลี้ยงเชื้อ Lactic acid โดยใช้อาหาร GYP broth มีสูตรองค์ประกอบคือ Yeast extract , Peptone , sodium acetate Anhydrous และ Glucose เมื่อเปรียบเทียบกับราคาของอาหาร MRS medium แล้วนั้นมีความถูกกว่ากันประมาณ 2- 3 เท่า (ณัฐฐินี จรกา.2560) แต่ในการผลิตแบคเทอริโอซินชินยังไม่มีการศึกษาว่าผลิตได้มากกว่าหรือไม่ จึงนำเอาสูตร media นี้มาใช้ศึกษา นอกจากนั้นแล้วยังได้มีการปรับเปลี่ยนการใช้น้ำตาลมาทดแทนน้ำตาล glucose ซึ่งมีการสนับสนุนของบริษัทที่ผลิตน้ำตาลของประเทศไทย เช่น บริษัทมิตรผล จำกัด ซึ่งมีน้ำตาลอยู่หลากหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นน้ำตาลทรายแดง กากน้ำตาล และน้ำตาลทรายที่ผลิตออกมาจำหน่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในยุคปัจจุบันนี้มีผู้สนใจที่จะนำเอาไนซินมาเป็นวัตถุกันเสียเพื่อที่จะมาใช้ในอาหาร

เนื่องจากไนซิน (nisin) แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) ใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหารประเภท สารกันเสีย (preservative) ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเน่าเสีย (microbial spoilage) และจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) มีความคงตัวที่ค่า pH เป็นกรด ทนต่อความร้อนได้สูง และถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนในทางเดินอาหารของมนุษย์ ไนซินได้รับอนุญาตให้ใช้ได้ในอาหาร เมื่อปีค.ศ. 1928 มีจำหน่ายในรูปผงแห้ง เป็นที่รู้จักกันดี เช่น ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทางการค้าว่า NisaplinTM (บริษัท Aplin and Barrentt Ltd., UK) ซึ่งสร้างจาก *Lactococcus lactis* และเพดิโอซิน PA-1/AcH (pediocin PA-1/AcH) โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า AL TATM 2431 (บริษัท Quest International, Austalia) ซึ่งสร้างจาก *Pediococcus acidilactici*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนซินมีการใช้แพร่หลายมากกว่า 48 ประเทศให้ผลในการยับยั้งในอาหารได้หลายประเภทเช่นในผลิตภัณฑ์นม (dairy product) โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก (fermentation milk) อาหารปรับกรด (acidifiled food) เนยแข็งและอาหารกระป๋อง โดยองค์การทางอาหารและยา (Food and Drug Administeation) ได้ยอมรับว่า NisaplinTM สามารถใช้ในรูปของสารกันเสีย (pervative) ที่มาจากธรรมชาติได้

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะดัดแปลงหาอาหาร ราคาถูกในการผลิตไนซินของเชื้อ *Lactococcus latis* (P2) เนื่องจาก ต้องการลดต้นทุนในการผลิตจุลินทรีย์ที่ผลิตไนซิน เพื่อเป็นทางเลือกจากการใช้ยาปฏิชีวนะและเวชภัณฑ์ ซึ่งเป็นต้นเหตุของเชื้อดื้อยาในคนไข้ที่เพิ่มมากขึ้น ทางผู้วิจัยจึงมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีผลในการยับยั้งของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยการผลิตไนซิน ซึ่งสร้างจากกลุ่มแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่บริเวณผิวหนัง (วัชรมาศ ม่วงแก้ว และคณะ 2558) และไนซินก็เป็นประโยชน์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มต่างๆ และมีผู้สนใจที่จะเอามาใช้เป็นสารถนอมอาหาร มีการใช้อย่างแพร่หลายในยุคปัจจุบันเช่นผลิตภัณฑ์เนยแข็ง Schillinger et al.(1996)

แต่อย่างไรก็ตามไม่ค่อยมีการศึกษาในเรื่องของการใช้อาหารที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลชนิดอื่นๆ นอกจาก MRS ในการศึกษาการผลิตไนซิน ดังหัวข้องานวิจัยนี้จึงมีบริษัทที่ผลิตน้ำตาลสนใจ ได้ให้การสนับสนุนน้ำตาลจำนวน 3 ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาความเป็นไปได้ของการสร้างแบคทีโรซิน โดยเอาน้ำตาลชนิดต่างๆ มาแทนกลูโคสในสูตรอาหรเหลว GYP broth ซึ่งการทดลองมีดังนี้

1.2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1. เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในสูตรอาหารที่ปรับเปลี่ยนน้ำตาลชนิดต่างๆ

1.2.2. เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารและชนิดน้ำตาลที่เชื้อสามารถเจริญและสร้างไนซินได้สูงที่สุด

1.2.3. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตไนซิน จากสูตรอาหารและชนิดน้ำตาลในข้อ 1.2.2

1.3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1. สามารถลดต้นทุนในการผลิตอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตแลคติกได้

1.3.2. สามารถสกัด ไนซิน เพื่อเพิ่มมูลค่าสินค้าทางเกษตรได้

1.3.3. มีความชำนาญในการใช้เครื่องมือเฉพาะยิ่งขึ้น

1.3.4. สามารถฝึกกระบวนการคิดวิเคราะห์ การวางแผนการทำงาน กระบวนการในการปฏิบัติงานให้มีความถูกต้องเหมาะสม และตรงตามวัตถุประสงค์ของงานได้อย่างมีคุณภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4. ขอบเขตการวิจัย

ทำการศึกษาการใช้น้ำตาลแต่ละชนิดทั้งหมด 3 สูตรได้แก่ 1. น้ำตาลทราย 2. น้ำตาลทรายแดง 3. กากน้ำตาล (โมลาร์ด) เปรียบเทียบกับสูตรอาหาร GYP ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส และทำการวิเคราะห์ทางเคมีซึ่งประกอบด้วย การวัดค่าของแข็งที่ละลาย (Brix น้ำตาล) การวัดค่า pH และจุลชีววิทยาซึ่งประกอบด้วย การหาจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้น และศึกษาการสร้างไนซินในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมาย เช่น *Listeria innocua* โดยดูความเข้มข้นของไนซินที่ผลิตได้ เป็นหน่วย Arbitrary unit (AU/ml.) โดยวิธี 2 fold dilution method นำสูตรอาหารและชนิดน้ำตาลที่เชื้อเจริญและผลิตไนซินได้มากที่สุด มาศึกษาการผลิตในระดับปริมาณที่สูงขึ้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

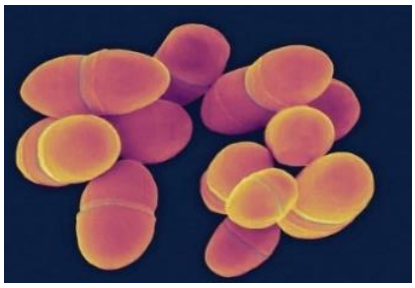
บทที่2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis เป็นจุลินทรีย์ที่จัดว่าเป็นแบคทีเรียแลคติก รูปร่างเป็นเซลล์ทรงกลมหรือรูปไข่ขนาดประมาณ 1.2 μm. คูณ 1.5 μm. ลักษณะเป็นคู่และเป็นสายสั้นเป็นแบคทีเรียแกรมบวกไม่เคลื่อนไหวและไม่สร้างสปอร์ดังรูปที่ 2.1. มักพบในนมและอาจเป็นสาเหตุของการเกิดรสเปรี้ยว *Lactococcus lactis* มีสองชนิดย่อยคือ lactis และ cremoris ซึ่งทั้งสองอย่างนี้มีความสำคัญในการผลิตชีสหลายชนิดและผลิตภัณฑ์นมหมัก *Lactococcus lactis* มีความเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกอื่น ๆ เช่น *Lactobacillus acidophilus* พบในทางเดินลำไส้ และ *Streptococcus salivarius* พบในช่องปาก อย่างไรก็ตาม *Lactococcus* spp. โดยปกติจะไม่ยึดเกาะเนื้อเยื่อของมนุษย์และแตกต่างจากแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติคอื่นๆ ในค่า pH เกลือและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในอุตสาหกรรมการผลิตชีส *Lactococcus lactis* ยังมีความสำคัญต่อการผลิตเนยแข็งเช่น Cheddar ครีมชีส Camembert Roquefort และ Brie รวมถึงผลิตภัณฑ์นมอื่นๆ เช่น เนย buttermilk ครีมเปรี้ยว และ kefir ยังมีการใช้สำหรับการดอกผัก เช่น แตงกวาดองและกะหล่ำปลีดอง เป็นต้น *Lactococcus lactis* สามารถใช้ในการเพาะเชื้อสายพันธุ์เดียวหรือเลี้ยงแบบผสมกับแบคทีเรียแลคติกอื่นๆได้ เช่น *Lactobacillus* spp. และ *Streptococcus sp.* เป็นต้น เมื่อเติม *Lactococcus lactis* ลงในนมจะใช้เอนไซม์ในการสร้างโมเลกุลพลังงาน (ATP) จากแลคโตส ผลพลอยได้จากการผลิต ATP คือกรดแลคติค ซึ่งกรดแลคติคทำให้นมตกตะกอนโปรตีน ใช้ในการผลิตชีส แต่นมเปรี้ยวไม่ใช่บทบาทเดียวของแบคทีเรียในการผลิตชีส กรดแลคติคยังช่วยลดค่า pH ของผลิตภัณฑ์ ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราที่ไม่พึงประสงค์ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ ทำให้สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานยิ่งขึ้น และเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Lactococcus lactis* มีส่วนช่วยให้เกิดกลิ่นและรสชาติที่ที่เฉพาะของผลิตภัณฑ์ (Kenneth, T.,2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



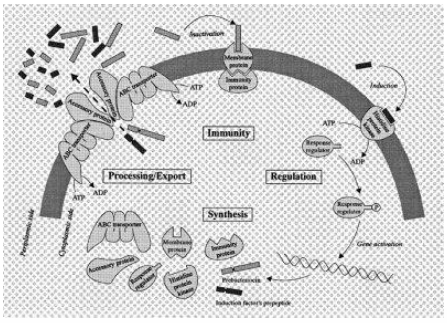
รูปที่ 2.1. Lactococcus lactis

ที่มา : https://fineartamerica.com

2.2**. แบคเทอริโอซิน (**bacteriocin)

แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins) เป็นสารประกอบโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ (proteinaceous antimicrobial substance) ชนิดหนึ่งซึ่งผลิตจากแบคทีเรียบางชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ในสปีชีส์หรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน กลไกการทำลายมีความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายที่แน่นอนดังรูปที่ 2.2. แบคเทอริโอซินบางชนิดสามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จึงใช้ร่วมกับการแปรรูปอาหารโดยใช้ความร้อนได้ แบคเทอริโอซินจะถูกยับยั้งด้วยเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน เช่น ทริบซิน เป็นต้น ปัจจุบันแบคเทอริโอซินกลายเป็นทางเลือกทางธรรมชาติที่น่าสนใจ เช่น สารกันบูด ยาปฏิชีวนะ และสารเคมี ซึ่งได้รับความสำคัญเชิงพาณิชย์ทั่วโลก การยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรค โดยการทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ การเจริญได้รับการปกป้องจากโปรตีนภูมิคุ้มกันชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะ ส่วนใหญ่แบ่งออกเป็น 4 Class ได้แก่ Class I Class II Class III และ Class IV แบคเทอริโอซินแบ่งตามวงแหวนได้แก่ (lantibiotics Nisin) (Pediocin) (Lactococcin B) (Acidocin CH5) (Curvacin A) และ (Sakacin) แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและใช้ในการถนอมอาหาร และอนุญาติให้ใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร ได้แก่ ไนซิน (BHARTI, et al.,2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

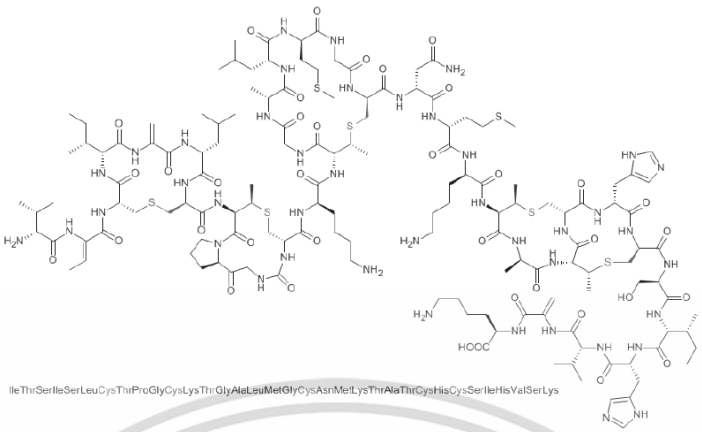


รูปที่ 2.2. แผนภาพแสดงการสร้าง การตัด และการส่งแบคทีริโอซินออกนอกเซลล์ผู้สร้าง
ที่มา : https://www.scimath.org

2.3. ไนซิน (Nisin)

ไนซิน (Nisin) เป็นสารคล้ายยาปฏิชีวนะที่เรียกว่า Bacteriocin ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* เป็นเชื้อที่ใช้ในระดับมาตรฐานอาหาร ไนซิน เป็นยาต้านจุลชีพตามธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวกหลากหลายชนิด รวมถึงเชื้อก่อโรคที่เกิดจากอาหาร เช่น *Listeria* spp. *Staphylococcus sp.* และ *Clostridium sp.* เป็นต้น เป้าหมายหลักของไนซิน ทำหน้าที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งแตกต่างจากเปปไทด์ต้านจุลชีพอื่นๆ ไนซิน ไม่จำเป็นต้องมีตัวช่วยในการเข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ อย่างไรก็ตาม ไนซิน ยังเป็นสารกันบูดตามธรรมชาติในชีสที่ถูกผลิตจาก *Lactococcus lactis* และใช้เป็นสารกันบูดในอาหารที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน และ อาหารที่มีค่า pH ต่ำ เนื่องจาก ไนซิน ไม่สามารถสังเคราะห์ทางเคมีได้จึงใช้สายพันธุ์ *Lactococcus lactis* ผลิตไนซินเพื่อสังเคราะห์ในอุตสาหกรรม มีการใช้ไนซินเป็นสารกันบูดครั้งแรกในผลิตภัณฑ์ชีสแปรรูป นอกจากนั้นแล้วยังมีการระบุการใช้งานอื่นๆ อีกมากมายในการถนอมอาหารและเครื่องดื่ม ปัจจุบันได้รับการยอมรับว่าเป็นสารกันบูดอาหารที่ปลอดภัย ในเกือบ 50 ประเทศ ไนซิน ถูกใช้เป็นสารกันบูดในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์ ผักกระป๋องอบ ผลิตภัณฑ์แป้งที่มีความชื้นสูง และไข่เหลวพาสเจอร์ไรส์ เป็นต้น จึงมีความน่าสนใจในการผลิตชีสแบบธรรมชาติ มีการวิจัยอย่างมากเกี่ยวกับคุณสมบัติ ต่อต้านลิสเทอเรียล (anti-listerial) ของ ไนซิน ในอาหาร และมีการนำเสนอการใช้งานจำนวนมาก การใช้ ไนซิน ในการควบคุมแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกที่ทำให้เน่าเสียได้ ซึ่งพบใน เบียร์ ไวน์ การผลิตแอลกอฮอล์ และอาหารที่มีกรดสูงเช่นน้ำสลัด การผลิต ไนซิน ที่บริสุทธิ์สูงดังโครงสร้างในรูปที่ 2.3. ทำให้เกิดความสนใจในการใช้ ไนซินสำ หรับการรักษาแผลในกระเพาะอาหารของมนุษย์และการควบคุมโรคเต้านมอักเสบในวัว (Kenneth, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

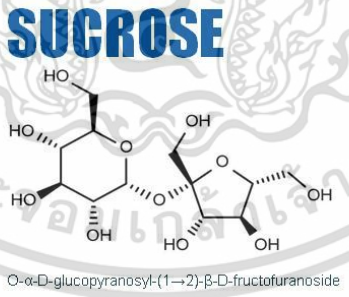


รูปที่ 2.3. ไนซิน (Nisin)

ที่มา : https://en.wikipedia.org/

2.4. น้ำตาลทราย (Sucrose)

น้ำตาลทราย (Sucrose) เป็นไดแซ็กคาไรด์ที่มีมากที่สุดในธรรมชาติถูกผลิตโดยพืช และไซยาโนแบคทีเรีย (สิ่งมีชีวิตสังเคราะห์แสง) และทำหน้าที่เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ขนส่งได้ และบางครั้งก็เป็นสารจัดเก็บข้อมูล ซูโครสเป็นรูปแบบการขนส่งคาร์บอนที่สะดวกสบายเนื่องจากมีการเชื่อมโยงที่ผิดปกติระหว่าง Anomeric C-1 ของกลูโคสและ Anomeric C-2 ของฟรุกโตส การไม่พร้อมใช้งานของคาร์บอน anomeric นี้ป้องกันน้ำตาลซูโครสที่มีโครงสร้างในรูปที่ 2.4. จากการไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ที่แยกคาร์โบไฮเดรตเช่นอะไมเลส และจากการทำปฏิกิริยาที่ไม่เกี่ยวกับกรดอะมิโนและโปรตีน (Feiner,G.(2016))



รูปที่ 2.4. น้ำตาลทราย (Sucrose)

ที่มา : https://www.clinicaltrialsarena.com/

2.5. น้ำตาลทรายดิบ (Raw sugar)

น้ำตาลทรายดิบ (Raw sugar) เป็นน้ำตาลซูโครสที่อยู่ในรูปผลึกที่มีความบริสุทธิ์ต่ำ มีลักษณะเป็นผลึกสีน้ำตาลอ่อนหรือน้ำตาลเข้มดังรูปที่ 2.5. มีความชื้นปานกลาง มีกากน้ำตาลมากเกล็ดน้ำตาลจับตัวกันแน่น ไม่ร่วน สามารถผลิตได้จากน้ำอ้อย ประกอบด้วยการหีบอ้อย การแยกสิ่งสกปรกด้วยการตกตะกอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การฟอกสีด้วยปูนขาว น้ำตาลชนิดนี้ไม่ใช่น้ำตาลบริโภค แต่ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ค่าทางน้ำตาลและสารอนุพันธ์,2019)

รูปที่ 2.5. น้ำตาลทรายดิบ (Raw sugar)

ที่มา : https://www.123rf.com/photo_16086637_raw-sugar-in-the-wood-spoon.html

2.6. กากน้ำตาล (Molasses)

กากน้ำตาล (Molasses) มีลักษณะเหนียวหนืดและมีสีเข้มดังรูปที่ 2.6. ซึ่งเป็นของเหลวสุดท้ายที่ได้จากการผลิตน้ำตาลซูโครส (น้ำตาลเชิงพาณิชย์) โดยกระบวนการระเหยซ้ำ การตกผลึก และการหมุนเหวี่ยงน้ำผลไม้จากอ้อยหรือน้ำตาลหัวบีต กระบวนการกลั่นทิ้งของเหลวที่มีความหนาซึ่งยังคงมีเปอร์เซ็นต์ซูโครสกลูโคส และฟรุกโตส อย่างมีนัยสำคัญ (อาจมีน้ำตาลซูโครส 20-30 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลกลูโคส และฟรุคโตส 15-25 เปอร์เซ็นต์) มีการใช้ทั่วไปในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพื่อรวมส่วนผสมของเหลวใดๆ ที่มีน้ำตาลเกินกว่า 43 เปอร์เซ็นต์ ในอดีตมีการใช้กากน้ำตาลในการประกอบอาหาร แต่ในปัจจุบันถูกแทนที่ด้วยน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (Sucrose) แม้จะมีการเปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์การใช้กากน้ำตาล แต่กากน้ำตาลยังคงเป็นส่วนประกอบสำคัญในอาหาร เช่น ขนมปังขิง และในการผลิตเหล้ารัมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังเป็นสารคีเลตติง (chelating) และถูกนำมาใช้ในการกำจัดสนิม เป็นสารเติมแต่งในอาหารสัตว์ และการผลิตเอทานอลแอลกอฮอล์ในอุตสาหกรรม และการผลิตยีสต์ (Innovative Food Processing Technologies, 2016)

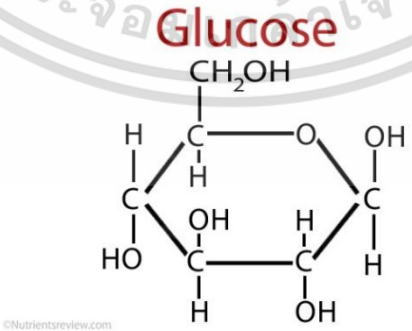
องค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาล มีระดับพลังงานระดับต่ำ ถึงปานกลางขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำที่มีอยู่ในกากน้ำตาล ซึ่งในกากน้ำตาลมีโปรแตสเซียม และมีปริมาณน้ำในระดับสูงทำให้เกิดเชื้อราได้ง่าย มีสารแทนนินจะทำให้มีรสฝาดขม และลดความสามารถในการย่อยของโภชนะทำให้โปรตีนตกตะกอน การใช้ประโยชน์ของโปรตีนลดลง ขัดขวางการใช้ประโยชน์ได้ของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน การทำงานของน้ำย่อย และรวมตัวกับกรดอะมิโนเมทไธโอนีน กากน้ำตาลมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน เป็นแหล่งของแร่ธาตุ ปลีกย่อยจะให้พลังงาน 4,010 Kcal/kg (DE) 3-5% (สุนทรีพร.2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ **2.6.** กากน้ำตาล(Molasses)
ที่มา : https://medium.com

2.7. กลูโคส (Glucose)

กลูโคส (Glucose) เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน 6 อะตอม และกลุ่มอัลดีไฮด์ เรียกว่าอัลโดฮอกโซ โครงสร้างของกลูโคส ยู่ในรูปแบบ open-chain (acyclic) และ ring (cyclic) เป็นคาร์โบไฮเดรต เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ดังโครงสร้างในรูปที่ 2.7. ในการเผาผลาญอาหารของสัตว์ กลูโคสเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์หลักของการสังเคราะห์ด้วยแสง และมีส่วนร่วมในการหายใจของเซลล์เพื่อผลิต ATP และ NADH กลูโคสเป็นหนึ่งในโมเลกุลหลักที่เซลล์ใช้เป็นแหล่งพลังงานและเมตาบอลิซึมระดับกลาง การเผาผลาญกลูโคสมีความสำคัญต่อการทำงานของร่างกายปกติ กลูโคสยังทำหน้าที่เป็นแหล่งของสารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยาสังเคราะห์ทางชีวภาพหลายอย่าง เมแทบอลิซึมของเซลล์กลูโคสนั้นเกี่ยวข้องกับกระบวนการไกลโคไลซิส, กลูโคเจนเจเนซิส, ไกลโคเจนเนซิส, ไกลโคเจน, เส้นทางเพนโตส - ฟอสเฟต, และวงจรกรดซิตริก (Toxicological Survey of African Medicinal Plants, 2014)

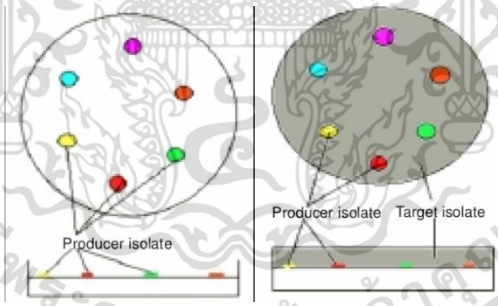


รูปที่ 2.7. กลูโคส (Glucose)
ที่มา : http://www.nutrientsreview.com/carbs/monosaccharides-glucose.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8. วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบจุด (spot inoculate)

วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบจุด (spot inoculate) คือการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Direct method เป็นการนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ติดสีแกรมบวก และไม่สามารถสร้างเอนไซม์ คาตาเลส ซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากการคัดแยกมาเลี้ยงเชื้อแบบจุด (spot inoculate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified MRS agar (M-MRS agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเททับหน้า (overlay) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งแข็ง TSBYE (Tryptic soy broth + 0.6% Yeast extract + 0.75% agar :TSBYE soft agar) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งผสมด้วยแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นประมาณ 10^6 CFU/ml นำจานเพาะเชื้อที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิซึ่งเหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยสังเกตจากวงใสรอบๆ โคโลนีที่หยดเชื้อดังรูปที่ 2.8. (ปรีชา ภูมิพื้นผล และคณะ,2010)



รูปที่ 2.8. วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบจุด (spot inoculate)

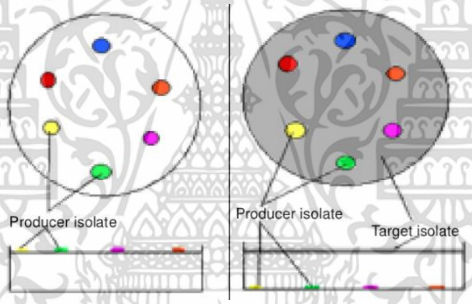
ที่มา : https://www.researchgate.net/figure/a-Direct-spot-on-lawn-method_fig2_47788521

2.9. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในอาหารเหลวด้วยวิธี Spot on lawn method

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในอาหารเหลวด้วยวิธี Spot on lawn method เลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้ ในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูม 30° C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4° C เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสมาปรับค่า pH ให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 6.5 ด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2.0 นอร์มัล จากนั้นกรองผ่านแผ่นเยื่อกรองที่มีขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร ซึ่งจะได้สารละลายส่วนใส ที่มีค่า pH เป็นกลางและปราศจากเชื้อ (cell-free neutralized supernatant : CFNS) นำ CFNS ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อลำดับละ 2 เท่าจนมีความเจือจาง 128 เท่า หยดสารละลายใสที่ความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนจานอาหาร TSAYE agar (Tryptic soy agar + 0.6% Yeast extract) ที่เททับด้วยอาหาร TSBYE soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมด้วยเชื้อทดสอบแต่ละชนิดที่ให้ผลบวกจากวิธี Direct method ดังรูปที่ 2.9. จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิซึ่งเหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถของ CFNS ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยสังเกตวงใสที่เกิดขึ้นบน ผิวหน้าอาหารซึ่งสามารถคำนวณค่ากิจกรรม (activity) ของสารยับยั้งจุลินทรีย์เป็นยูนิตต่อมิลลิลิตร (AU/ml) ด้วยวิธี critical dilution method เป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Mayr-Harting et al. (1972) โดยใช้ส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดของ CFNS ซึ่งยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใสที่เกิดจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบและคูณด้วย 100 (ปรีชา ภูมิพื้นผล และคณะ,2010)



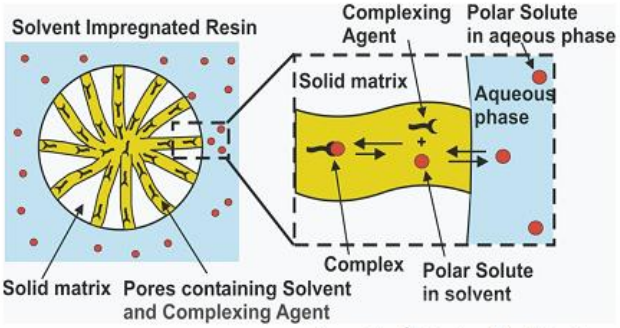
รูปที่ 2.9. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในอาหารเหลวด้วยวิธี Spot on lawn method

ที่มา : https://www.researchgate.net/figure/a-Direct-spot-on-lawn-method_fig2_47788521

2.10. amberlite xad-16 bead resins

การแยกสารโดยใช้เรซินที่เอิบชุ่มด้วยตัวสกัด (solvent impregnated resin) เป็นการใช้เทคนิคที่ผสมผสานระหว่าง การดูดซับสารโดยการแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange) และการถ่ายโอนมวลสารของการสกัดด้วยตัวสกัด (solvent extraction) เพื่อทำให้การแยกสารมีความรวดเร็วสูงมากกว่าการแยกสารโดยการแลกเปลี่ยนไอออน และเครื่องมือ และระบบที่ใช้ก็มีความซับซ้อนน้อยกว่าการสกัดด้วยตัวสกัด ซึ่งในการใช้งาน เรซินจะถูกทำให้ชุ่มด้วยตัวสกัดที่เป็น สารอินทรีย์ โดยตัวสกัดแทรกซึมอยู่ในรูพรุนของเรซิน และตัวสกัดนี้จะทำการจับแยกธาตุที่ต้องการออกจากสารละลาย เมื่อมีการผ่านสารละลายเข้าไป ซึ่งการสกัดสารด้วยตัวสกัดนี้ จะมีความรวดเร็วกว่าการจับด้วยการแลกเปลี่ยนไอออน ดังรูป 2.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



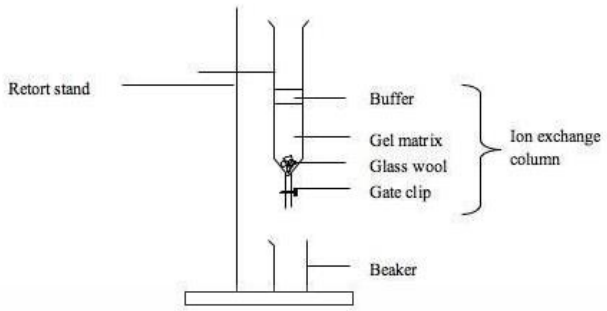
รูปที่ 2.10. การแยกสารโดยใช้เรซินที่เอิบชุ่มด้วยตัวสกัด (solvent impregnated resin)
ที่มา : http://www0.tint.or.th/

เรซิน (macroporous polymeric resin) ที่ใช้สำหรับการสกัดโดยวิธีนี้ ผลิตจากพอลิเมอร์ที่ต้องมีความแข็งแรง ไม่ทำ ปฏิกิริยากับตัวสกัดและสารละลายที่ใช้ โครงสร้างต้องมีรูพรุนและมีพื้นที่ผิว สูง สามารถดูดซับตัวสกัดเข้าไปได้จำนวน มาก และยึดตัวสกัดไว้ได้ดีในโครงสร้าง นอกจากนี้ต้องไม่มีการพองตัวมากจนเกินไปเมื่อมีการดูดซับตัวสกัดไว้ เพื่อไม่ให้มีการเสียรูปทรงได้ง่าย เรซินที่นิยมใช้ ได้แก่ Amberlite XAD ของ Rohm & Haas Co. ซึ่งผลิตจาก polystyrene divinylbenzene (พิพัฒน์ พิเชษฐพงษ์ และคณะ,2553)

2.11. Ion-exchange chromatography

การแลกเปลี่ยนไอออนโครมาโตกราฟี (Ion-exchange chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกโมเลกุลตามประจุตัวอย่าง เช่น สามารถใช้ในการชำระล้างโมเลกุลที่มีประจุ ตัวอย่างช่น โปรตีน กรดอะมิโน และ นิวคลีโอไทด์ การแลกเปลี่ยนไอออนโครมาโตกราฟีขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดของประจุ และโมเลกุลที่มีประจุบวกหรือลบ โปรตีนกรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์แต่ละตัว มีประจุซึ่งขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดของสารละลายโดยรอบ ดังนั้นตัวอย่างจะต้องใส่ลงในสารละลายที่บัฟเฟอร์ส่วนผสมที่มีค่า pH เฉพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11. การแลกเปลี่ยนไอออนโครมาโตกราฟี (Ion-exchange chromatography)
ที่มา : https://www.sciencelearn.org.nz/resources/2046-ion-exchange-chromatography

2.10.1. การเตรียมคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน (Preparing the ion exchange column)

การเตรียมคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน (Preparing the ion exchange column) คอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนประกอบด้วยเจลเมทริกซ์ที่ทำจากเม็ดบีดที่มีกลุ่มทำงานที่มีประจุ กลุ่มการทำงานที่ใช้จะขึ้นอยู่กับโมเลกุลที่ถูกกำหนดเป้าหมายสำหรับการแยก ตัวอย่างเช่น หากโมเลกุลที่จะสกัดจากตัวอย่างมีประจุเป็นบวกกลุ่มฟังก์ชันในคอลัมน์จะมีประจุลบ

2.10.2. การแยกตัวอย่าง (Separating the sample)

การแยกตัวอย่าง (Separating the sample) ตัวอย่างถูกเทลงในคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนอย่างช้าๆ เมื่อของเหลวไหลผ่านเจลเมทริกซ์ไอออนจะจับกับกลุ่มฟังก์ชันในคอลัมน์ในขณะที่สารละลายที่เหลือไหลผ่านและสามารถเก็บได้เมื่อออกจากด้านล่างของคอลัมน์

2.10.3. การเก็บตัวอย่าง (Collecting the sample of interest)

การเก็บตัวอย่าง (Collecting the sample of interest) เพื่อรวบรวมโมเลกุลที่ถูกผูกไว้กับคอลัมน์จะต้องได้รับการปล่อยตัวจากกลุ่มการทำงานในเมทริกซ์เจล สิ่งนี้เรียกว่าการชะล้าง สามารถทำได้หนึ่งใน2วิธี

2.10.3.1. การเปลี่ยนประจุของโมเลกุลในตัวอย่าง - ทำได้โดยการใช้บัฟเฟอร์ของค่า pH ที่แตกต่างกันผ่านคอลัมน์ เรื่องนี้ส่งผลกระทบต่อรูปร่างของโมเลกุลที่ถูกผูกไว้ดังนั้นส่วนใดของโมเลกุลที่ถูกเปิดเผยทำให้เปลี่ยนประจุโดยรวม

2.10.3.2. แทนที่โมเลกุลที่ถูกผูกไว้กับสิ่งอื่น หากอิออนที่ดึงดูดกลุ่มการทำงานในเมทริกซ์เจลวิ่งผ่านคอลัมน์มากขึ้นพวกมันจะกำจัดโมเลกุลที่ถูกผูกไว้แล้ว โมเลกุลที่บริสุทธิ์จากตัวอย่างสามารถถูกรวบรวมได้เมื่อมันหลุดออกจากเมทริกซ์ในคอลัมน์ (Loughnane,S.2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1. เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1. เชื้อแบคทีเรียแลคติกได้รับจาก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ดังนี้

3.1.1.1. *Lactococcus lactis* (P2)

3.1.1.2. *Lactobacillus plantarum* SKI2

3.1.1.3. *Lactococcus lactis* (SB2)

3.1.1.4. *Lactococcus lactis* NCDO

3.1.1.4. *Pediococcus pentosaceus* 536

3.1.1.2. *Listeria innocua*

3.2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.2.1. น้ำตาลทรายขาว (ได้รับการสนับสนุนจาก บริษัท มิตรผล จำกัด)

3.2.2. น้ำตาลทรายแดง (ได้รับการสนับสนุนจาก บริษัท มิตรผล จำกัด)

3.2.3. กากน้ำตาล (ได้รับการสนับสนุนจาก บริษัท มิตรผล จำกัด)

3.2.4. Sodium Acetate (QRëC™, New Zealand)

3.2.5. Tween 80

3.2.6. Calcium carbonate (Loba Chemie Pvt, Indea)

3.2.7. Yeast extract (iYeast, Japan)

3.2.8. Peptone (SRL, India)

3.2.9. Calcium chloride

3.2.10. Butterfield's phosphate

3.2.11. Nutrient agar (NA) (Himedia, India)

3.2.12. De Man, Rugose and Sharpe agar (MRS agar) (Oxoid, UK)

3.2.13. Bifidus Selective Medium Agar (BSM agar)

3.2.14. de Man, Rugose and Sharpe soft agar (MRS soft agar)

3.2.15. Trypticase soy soft agar (TSB soft agar) (Difco, France)

3.2.16. De Man, Rugose and Sharpe broth (MRS broth)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.17. Trypticase soy broth (TSB broth) (Himedia, India)

3.2.18. น้ำกลั่น

3.2.19. Sodium Hydrogen Phosphate

3.2.20. Sodium chloride (CARLLO Erba, France)

3.2.21. Disodium Hydrogen Phosphate

3.2.22. XAD 16

3.2.23. de ionized water

3.2.24. Ethanal

3.2.24.1. 40 % Ethanal

3.2.24.2. 70 % Ethanal

3.2.24.2. 95 % Ethanal

3.2.5. Isopropanol (CARLLO Erba, France)

3.2.25.1. 50 % Isopropanol

3.2.25.2. 70 % Isopropanol

3.2.25.3. 100 % Isopropanol

3.2.26. สีย้อมแกรม

3.2.26.1. สีย้อม Gram Crystal violet

3.2.26.2. สีย้อม Gram safranin O

3.2.26.3. สีย้อม Gram iodine

3.2.27.สารสอบเทียบเครื่องวัด pH

3.2.27.1. สารสอบเทียบ pH เท่ากับ 4

3.2.27.2. สารสอบเทียบ pH เท่ากับ 7

3.3. อุปกรณ์

3.3.1. Beaker ขนาด 50,100,250,600,1000 ml.

3.3.2. Eppendorf ขนาด 1.5 ml.

3.3.3. Eppendorf rack

3.3.4. Test tube ขนาด 16*150 cm.

3.3.5. Test tube rack

3.3.6. ฟอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.7. ช้อนตักสาร

3.3.8. ลูปเขี่ยเชื้อ

3.3.9. ลูกยาง

3.3.10. ขวดขนาด 250 ml.

3.3.11. ขวดDuran ขนาด 250,500 และ 1000 ml.

3.3.12. จานเพาะเชื้อพลาสติก

3.3.13. ไฟแช็ค

3.3.14. ตะเกียงบุนเซน

3.3.15. ปิ๊บ

3.3.16. เทียนไข

3.3.17. Centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 ml.

3.3.18. แผ่นสไลด์

3.3.19. กระบอกตวง ขนาด 250, 500, 1000 ml.

3.3.20. Grass Pipette ขนาด 1, 5, 10 ml.

3.3.21. Pipette tips ขนาด 100, 1000 µl.

3.3.22. Micropipette ขนาด 100, 1000 µl.

3.3.23. Cylinder ขนาด 10 ml.

3.3.24. Filter ขนาด 0.2 µm.

3.3.25. แท่งแก้วคนสาร ขนาด 18 นิ้ว

3.3.26. Megnetic Bar, Magnetic Stirrer (Hot magnetic stirrer (digital) C-MAG HS7 digital)

3.3.27. ขวดก้นกลม

3.3.28. stand

3.3.29. แท่งแก้วสามเหลี่ยม

3.3.30. ขวดแยม

3.4. เครื่องมือ

3.4.1. ตู้บ่มเพาะเชื้อ 30°C (Incubator รุ่น CLW32)

3.4.2. ตู้บ่มเพาะเชื้อ 37°C (Thermo specific HERAEUS)

3.4.3. ตู้ปลอดเชื้อ Biosafety Cabinet Class II

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4. ตู้ปลอดเชื้อ Larminar flow รุ่น ABS 1200

3.4.5. ตู้ปลอดเชื้อ Larminar flow รุ่น SSC HVB90

3.4.4. ตู้อบลมร้อน (Memmert รุ่น BE)

3.4.5. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (AND รุ่น GF-3000)

3.4.7. เครื่องผสมสารในหลอดทดลอง (Yakos Taiwan รุ่น HAS-120-)

3.4.8. เครื่องปั่นเหวี่ยงคุมอุณหภูมิ (Thermo Sorvall รุ่นLegend 1.6 R)

3.4.9. เครื่องปั่นเหวี่ยงไมโครคุมอุณหภูมิ (eppendorf รุ่นCentrifuge 5804 R)

3.4.10. ตู้อบไมโครเวฟ (Sharp รุ่น R-222)

3.4.11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Dihan scientic)

3.4.12. ตู้เย็น

3.4.13. ห้องเย็น

3.4.14. เครื่องนึ่งความอันไอ (ASC รุ่นES-315)

3.4.15. คอลัมน์

3.4.16. เครื่องวัด pH(Benchtop pH meter)

3.4.17. เครื่องกลั่นระเหย (Buchi รุ่น R-114)

3.4.18 กล้องจุลทรรศน์

3.5. ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.5.1 การศึกษาการเลี้ยงเชื้อและลักษณะของเชื้อ *Lactococcus lactis* P2, *Listeria innocua*

3.5.1.1 การศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus Lactis* P2 ในอาหารมาตรฐาน

ก่อนการทดสอบเก็บเชื้อ *Lactococcus Lactis* P2 ลงในสต็อกกลีเซอรอล เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อจาก สต็อกกลีเซอรอล. 100 µl ลงในอาหาร MRS broth ที่มีปริมาตร 10 ml จากนั้นนำไปบ่ม ที่ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำเชื้อที่บ่มครบ 24 ชั่วโมง จำนวน 100 µl ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาตร 10 ml ลงในอารหาร MRS broth และ GYP brothจากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.5.1.2 การศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* P2 ในอาการที่ใช้น้ำตาลทรายแดงแทนกลูโคส (RYP)

ก่อนการทดสอบเก็บเชื้อ *Lactococcus lactis* P2 ลงในสต็อกกลีเซอรอล เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อจาก สต็อกกลีเซอรอล 100 µl ลงในอาหาร MRS broth ที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตร 10 ml จากนั้นนำไปบ่ม ที่ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและนำเชื้อที่บ่มครบ 24 ชั่วโมง จำนวน 100 µl ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาตร 10 mlลงในอาหาร RYP broth จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.5.1.3 การศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Listeria innocua*

ก่อนการทดสอบเก็บเชื้อ *Listeria innocua* ลงในสต็อกกลีเซอรอล เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อจาก สต็อกกลีเซอรอล 100 µl. ลงในอาหาร TSB broth ที่มีปริมาตร 10 ml จากนั้นนำไปบ่ม ที่ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำเชื้อที่บ่มครบ 24 ชั่วโมง จำนวน 100 µl ถ่ายลงในอาหาร TSB broth ที่มีปริมาตร 10 ml และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.5.1.4 การศึกษาลักษณะของเชื้อโดยวิธีการย้อมแกรม

smear เชื้อลงบนแผ่ยสไลด์หยดสี Crystal violet ลงให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างสีออกด้วยน้ำกลั่นที่ไหลเบาๆ หยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้ 30 วินาทีแล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ไหลเบาๆจากนั้น ล้างสีออกด้วย 95% Alcohol ประมาณ 10 ถึง 20 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น

และย้อมด้วย Safranin O ทิ้งไว้ 30 วินาที่ ล้างออกด้วยน้ำกลั่น วางสไลด์ไว้ให้แห้งสนิทหรือซับด้วยกระดาษทิชชู่ จากนั้นนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์

3.5.2. การวัดปริมาณ Brix และค่า pH ของน้ำตาลแต่ละชนิด

3.5.2.1 วัดค่า Brix ของอาหารมาตรฐาน MRS และ GYP

นำอาหารมาตรฐาน MRS และ GYP แต่ละชนิดละลายน้ำ ในปริมาตร 10 ,100 ,1000 ml. จากนั้นนำมาหยดลงบน hand refractometer เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายที่ละลายในน้ำ

3.5.2.2 วัดค่า Brix ของน้ำตาล 3 ชนิด (น้ำตาลทราย, น้ำตาลทรายดิบ, กากน้ำตาล)

นำน้ำตาลแต่ละชนิดละลายน้ำ ในปริมาตร 10 ,100 ,1000 ml. จากนั้นนำมาหยดลงบน hand refractometer เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายที่ละลายในน้ำเปรียบเทียบกับเปอร์เซนต์ Brix ของอาหารมาตรฐาน MRS และ GYP

3.5.2.3 ทำการทดลองหาปริมาตรของน้ำตาลแต่ละชนิดที่ละลายในน้ำให้มีความเข้มข้นเท่ากับ Brix ของสูตรอาหารมาตรฐาน

3.5.2.4. เปรียบเทียบการสร้างแบคเทอริโอซินของอาหารที่ปรับสูตรน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด โดยทำการทดลอง 3 ความเข้มข้นคือ 2% 4% และ 6% SYP คืออาหารที่ปรับสูตรน้ำตาลโดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลทรายทดแทนน้ำตาลกลูโคส ที่ 2% ใช้น้ำตาลทราย 2 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร ที่ 4% ใช้น้ำตาลทราย 4 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร ที่ 6% ใช้น้ำตาลทราย 6 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร RYP คืออาหารที่ปรับสูตรน้ำตาลโดยใช้น้ำตาลทรายดิบทดแทนกลูโคส ที่ 2% ใช้น้ำตาลทรายดิบ 2 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร ที่ 4% ใช้น้ำตาลทรายดิบ 4 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร ที่ 6% ใช้น้ำตาลทรายดิบ 6 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร MYP คืออาหารที่ปรับสูตรน้ำตาลโดยใช้กากน้ำตาลทดแทนกลูโคส ที่ 2% ใช้กากน้ำตาล 3 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร ที่ 4% ใช้กากน้ำตาล 4 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร ที่ 6% ใช้กากน้ำตาล 6 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร

3.5.2.5. ทำการเลือกน้ำตาลทดแทนกลูโคสและค่า %Brix ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างแบคเทอริโอซิน และเชื้อแลคติกสามารถเจริญได้ดีที่สุด

3.5.2.6 วัดค่า pH

วัดค่า pH อาหารมาตรฐาน และ อาหารที่ใช้น้ำตาลชนิดต่างๆทดแทน

3.5.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อและการสร้างแบคเทอริโอซินในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ จากการศึกษาข้อที่ 3.5.2 ใช้น้ำตาลในช่วงของอาหาร MRS และ GYP

3.5.3.1. การเจริญของเชื้อ *Lactococcus lactis* P2 ในอาหาร (MRS , GYP, RYP)

ทำการถ่ายเชื้อจาก สต็อกกลีเซอรอล 100 µl ลงในอาหาร MRS broth ที่มีปริมาตร 10 ml จากนั้นนำไปบ่ม ที่ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำเชื้อที่บ่มครบ 24 ชั่วโมง จำนวน 100 µl ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาตร 10 ml ลงในอารหาร MRS broth , GYP broth และRYP broth จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

จากนั้นนำเชื้อในอาหาร MRS broth , GYP broth และRYP broth ที่บ่มไว้ มาทำการเจือจางเป็นลำดับส่วน โดยใช้ Butterfield's phosphate 9 ml ต่อ เชื้อ 1 ml จากนั้นดูดแต่ละลำดับส่วนโดยใช้ ไมโครปิเปต ปริมาตร 10 µl ลงบนจานเพาะเชื้อ MRS agar และทำการ Spreed Plate เกลี่ยเชื้อให้กระจายให้ทั่วบนผิวหน้าอาหาร โดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.5.3.2 การสร้างแบคเทอริโอซิน ของเชื้อ *Lactococcus lactis* P2 ในอาหาร (MRS, GYP, RYP)

นำเชื้อจุลินทรีย์อินดิเคอเตอร์ *Listeria innocua* ทำการถ่ายเชื้อ Listeria innocua จากสต็อกกลีเซอรอล 100 µl. ลงในอาหาร TSB broth ที่มีปริมาตร 10 ml จากนั้นนำไปบ่ม ที่ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำเชื้อที่บ่มครบ 24 ชั่วโมง จำนวน 100 µl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ่ายลงในอาหาร TSB broth ที่มีปริมาตร 10 ml และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อ ปริมาณ 10 µl. ใส่ลงในอาหาร TSB soft agar ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารในหลอด และเททับลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA agar อยู่

จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ *Lactococcus lactis* P2 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในโดย การถ่ายเชื้อจาก สต็อกกลีเซอรอล 100 µl ลงในอาหาร MRS broth ที่มีปริมาตร 10 ml จากนั้นนำไปบ่ม ที่ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำเชื้อที่บ่มครบ 24 ชั่วโมง จำนวน 100 µl ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาตร 10 ml ลงในอารหาร MRS broth , GYP broth และRYP broth จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาปั่นเหวี่ยง 5000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4˚C 15 นาที โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงคุมอุณหภูมิ จากนั้นกรองน้ำหมักที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วย Filter ขนาด 0.2 µm และนำน้ำหมักที่ผ่านการกรอง มาเจือจางเป็นลำดับส่วนโดยใช้น้ำหมัก 100 µl ต่อ น้ำกลั่นแช่เย็น 100 µl แล้วทำการสปอตน้ำหมักในแต่ละความเข้มข้นลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้ออาหาร NA agar ที่ถูกเททับด้วยอาหาร TSB soft agar จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสร้างแบคเทอริโอซิน ของอาหารที่ปรับสูตรน้ำตาล

นำน้ำหมักส่วนที่เหลือจากกระบวนการตกตะกอนอย่างรวดเร็ว (Centrifuge) มาวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter ทำการวัด 3 ซ้ำจนได้ค่าที่น่าเชื่อถือ

3.5.8. การศึกษาการสกัด ไนซิน ด้วย XAD 16

ทำการถ่ายเชื้อจาก สต็อกกลีเซอรอล ในข้อ 3.5.1. 100 µl ลงในอาหาร MRS broth ที่มีปริมาตร 10 ml จากนั้นนำไปบ่ม ที่ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำเชื้อที่บ่มครบ 24 ชั่วโมง จำนวน 10 ml ถ่ายลงในอาหาร 4 % RYP broth ที่มีปริมาตร 1000 ml จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำน้ำหมัก1000ml ปั่นเหวี่ยง 5000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4˚C 15 นาที โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงคุมอุณหภูมิ เก็บส่วนใส่ประมาณ 10 ml ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง มาทดสอบการสร้างแคทิโรซิน ในข้อ 3.5.6.

นำ XAD 16 ปลอดเชื้อ 20 g. ใส่ลงในส่วนใส่ที่เหลือ จากนั้นใช้ Magnetic stirrer ในการผสมและคุมอุณหภูมิ 5 ˚C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง กรองน้ำหมักที่มี XAD 16 ผ่านคอลัมน์ นำน้ำหมักที่กรองได้ทดสอบการผลิตแบคทิโรซินในข้อ 3.5.6 และล้าง XAD 16 ในคอลัมน์ด้วยน้ำ DI 100 ml. ต่อมาล้างด้วย 40 % Ethanolเพียว 20 ml. นำน้ำ DI และ 40 % Ethanol ที่ผ่านการล้างมาทดสอบการผลิตแบคทิโรซิน ในข้อ 3.5.6.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

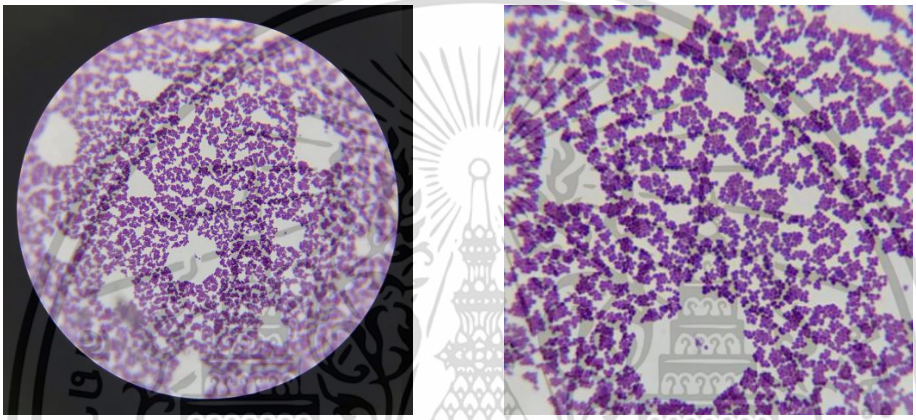
จากนั้นสกัดสารสำคัญที่ถูกดูดซับไว้ใน XAD 16 ในคอลัมน์ ใช้ 70 % Isopropanol 100 ml. เขย่าทุกๆ 15 นาที 2 ชั่วโมง และ 100% Isopropanol 20 ml. เขย่าทุกๆ 15 นาที 30 นาที ตามลำดับ นำ 70% Isopropanol 100 ml. และ 100% Isopropanol 20 ml. ที่ได้จากการล้างรวมกัน 120 ml. ใส่ขวด และนำไปกลั่น โดยใช้เครื่อง Evaporator อุณหภูมิ 43°C ที่ความดัน 40 kpa ทำการกลั่นจนเหลือประมาณ 30 ml. แล้วนำไปทดสอบการผลิตแบคทิโรซิน ปรับใช้วิธีการทดสอบจาก (Loughnane,S.2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

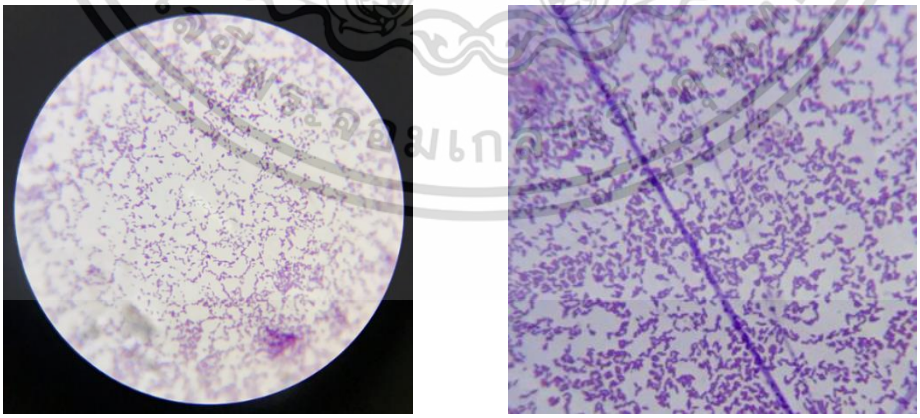
4.1. ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Lactococcus Lactis* P2 และ เชื้ออินดิเคเตอร์ *Listeria innocua*

4.1.1. ลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Lactococcus Lactis* (P2) จากการดำเนินการทดลองในข้อ 3.5.1. ได้ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lactococcus Lactis* (P2) ดังนี้



รูปที่ 4.1.1. ลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Lactococcus lactis* P2 จากกล้องจุลทรรศน์ ด้วยกำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 1000 X

4.1.2. ลักษณะทางกายภาพของเชื้ออินดิเคเตอร์ *Listeria innocua* จากการดำเนินการทดลองในข้อ 3.5.1. ได้ทำการถ่ายเชื้อตัวชี้วัด *Listeria innocua* ดังนี้



รูปที่ 4.1.2. ลักษณะทางกายภาพของเชื้ออินดิเคเตอร์ *Listeria innocua* จากกล้องจุลทรรศน์ ด้วยกำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 1000 X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2. ผลการศึกษาค่าของแข็งที่ละลายน้ำ (%˚Brix ของน้ำตาลกลูโคส)

ตารางที่ 4.2.1. ค่าของของแข็งที่ละลาย (%˚Brix ของน้ำตาลกลูโคส) ของสารละลายอาหารมาตรฐาน

ตารางการการวัดค่าของแข็งที่ละลายน้ำ (%˚Brix ของน้ำตาลกลูโคส)		
จำนวนการครั้ง	ชนิดของอาหารมาตรฐาน	
	MRS medium	GYP medium
1	6.1	4.1
2	6.1	4.1
3	6	4.1
เฉลี่ย	6.1	4.1

จากการศึกษาค่าของแข็งที่ละลายน้ำ (%˚Brix ของน้ำตาลกลูโคส) ของสารละลายอาหารมาตรฐาน MRS medium และ GYP medium ซึ่งน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนหลักที่ใช้ในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าในอาหาร MRS medium มีค่า%˚Brix ของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 6.1 %˚Brix และ GYP mediumมีค่า%˚Brix ของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 4.1 %˚Brix จึงใช้ค่าดังกล่าวในการศึกษาขั้นตอนการปรับปริมาตรของน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยเลือกใช้ 6.0 %˚Brix อ้างอิงจากค่า%˚Brix ของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium เนื่องจากเมื่อทำการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลกติค มีความสามารถในการเจริญมากกว่าการเลี้ยงในอาหาร GYP medium ดังแผนภูมิรูปแท่งที่ 4.3.1.

ตารางที่ 4.2.2. การศึกษาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำของน้ำตาลชนิดต่างๆ ปรับเป็น 6.0 %˚Brix ของน้ำตาล

การศึกษาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำของน้ำตาลชนิดต่างๆ ปรับเป็น 6.0 %˚Brix น้ำตาล				
ชนิดของน้ำตาล	Sucrose Sugar (g.)			
ปริมาตรสารละลาย ml.	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
100	6	6	6	6
500	30	30	30	30
1000	60	60	60	60
ชนิดของน้ำตาล	Row sugar (g.)			
ปริมาตรสารละลาย ml.	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
100	6	6	6	6
500	30	30	30	30
1000	60	60	60	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

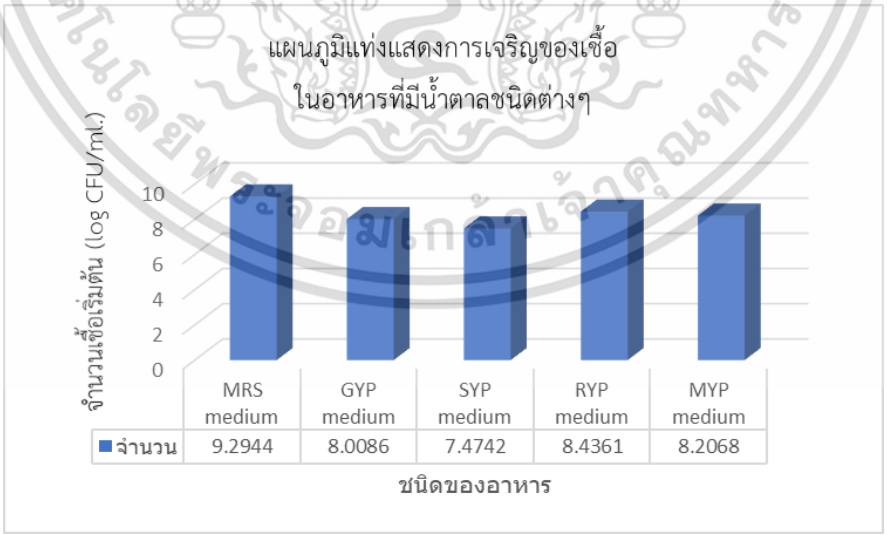
การศึกษาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำของน้ำตาลชนิดต่างๆ ปรับเป็น 6.0 %˚Brix น้ำตาล (ต่อ)				
ชนิดของน้ำตาล	Molasses(g.)			
ปริมาตรสารละลาย ml.	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
100	7	7	7	7
500	30	30	30	30
1000	70	70	70	70

จากผลการศึกษาในตารางที่ 4.2.2. พบว่าปริมาณน้ำตาลทรายที่ใช้ในการปรับค่าเป็น 6.0 %˚Brix เท่ากับ 6, 30 และ 60 กรัม ในน้ำกลั่น 100, 500 และ 1000 ml. ซึ่งมีค่าเท่ากับปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่ใช้ในการละลาย มีค่าเท่ากับ 6, 30 และ 60 กรัม ในน้ำกลั่น 100, 500 และ 1000 ml. และปริมาณกากน้ำตาลที่ใช้ในการละลายเท่ากับ 7, 30 และ 60 กรัม ในน้ำกลั่น 100, 500 และ 1000 ml. ใช้ผลการศึกษาข้างต้นในการศึกษาการเจริญของเชื้อและการสร้างแบคเทอริโอซินในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ และแสดงผลการศึกษาดังหัวข้อ 4.2

4.3. ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อและการสร้างแบคเทอริโอซินในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ

4.3.1. การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติค *Lactococcus lactis* (P2) ในหัวข้อ 3.4.3 แสดงผลการศึกษาดังแผนภูมิแท่งรูปที่ 4.3.1.

แผนภูมิแท่งที่ 4.3.1. การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ ปรับเป็น 6.0 %˚Brix

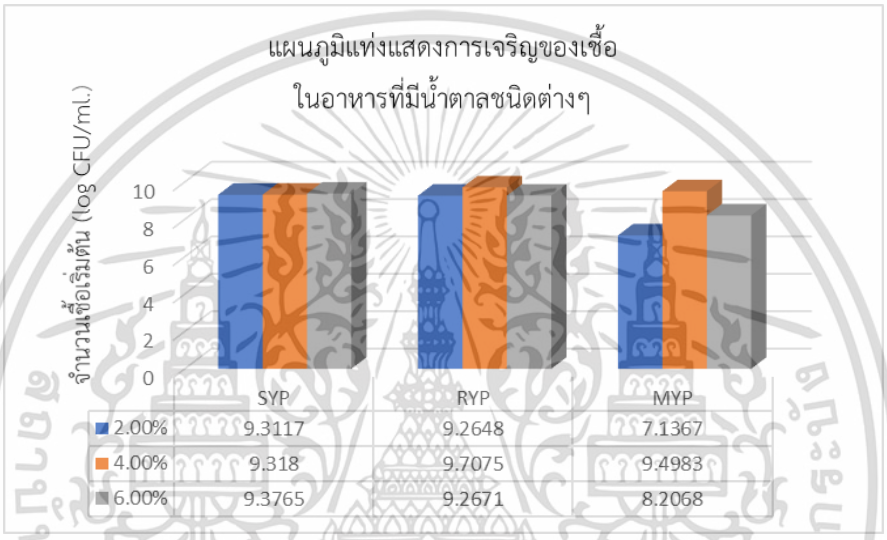


จากการศึกษาในตารางที่ 4.3.1. พบว่าแบคทีเรียแลคติคสามารถเจริญในอาหารที่มีการใช้น้ำตาลทรายดิบ แทนน้ำตาลกลูโคส ได้ดีที่สุดเท่ากับ 8.4361 log CFU/ml. เนื่องจากมีการเจริญใกล้เคียงกับอาหาร MRS medium และมีการเจริญสูงกว่าในอาหาร GYP medium ในรายงานของ H. CHICK (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการรายงานการทดสอบการเจริญเติบโตของ แบคทีเรียแลคติก โดยใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ทดแทนการใช้กลูโคส พบว่าน้ำตาลทรายขาวสร้างการเจริญได้สูงสุด เท่ากับ 8.57 log CFU/ml. ใน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเศียส ของเชื้อ *Streptococcus thermophilus* ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรแลคติกได้เหมือนกับกับในงานวิจัยฉบับนี้ จากผลดังกล่าวจึงมีความไกล้เคียงกัน

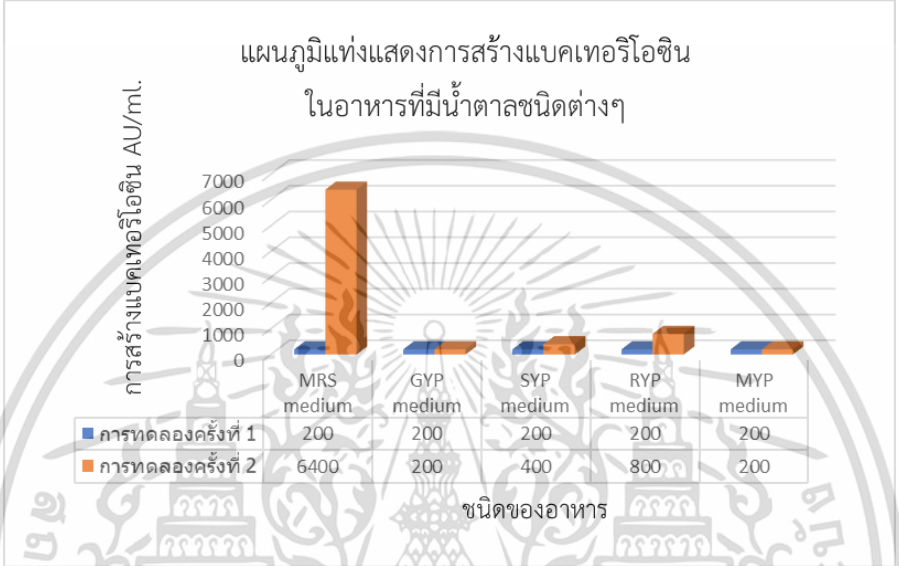
แผนภูมิแท่งที่ 4.3.2. การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ ปรับเป็น 2.0, 4.0 และ 6.0 %



จากการศึกษาในตารางที่ 4.3.2. อาหาร RYP medium ที่ปรับค่าเป็น 4 % ของอาหาร แสดงผลการเจริญของเชื้อเท่ากับ 9.7075 log CFU/ml. มีการเจริญมากกว่าสูตร SYP medium ที่มีการเจริญสูงสุด เท่ากับ 9.3765 log CFU/ml. เมื่อปรับเป็น 6 % ของอาหาร และ MYP medium ที่มีการเจริญสูงสุด เท่ากับ 9.4983 log CFU/ml. เมื่อปรับเป็น 4 % ของอาหาร จากผลข้างต้นพบว่าสูตรอาหาร SYP broth เมื่อมีการปรับปริมาณตามเป็น 2, 4 และ 6 % ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ในส่วนของอาหาร RYP broth เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนใน RYP broth 4 % เนื่องจากเพิ่มจาก 2 และ 6 % ค่อนข้างมาก และในอาหาร MYP broth 4 % ส่งเสริมการเจริญได้สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

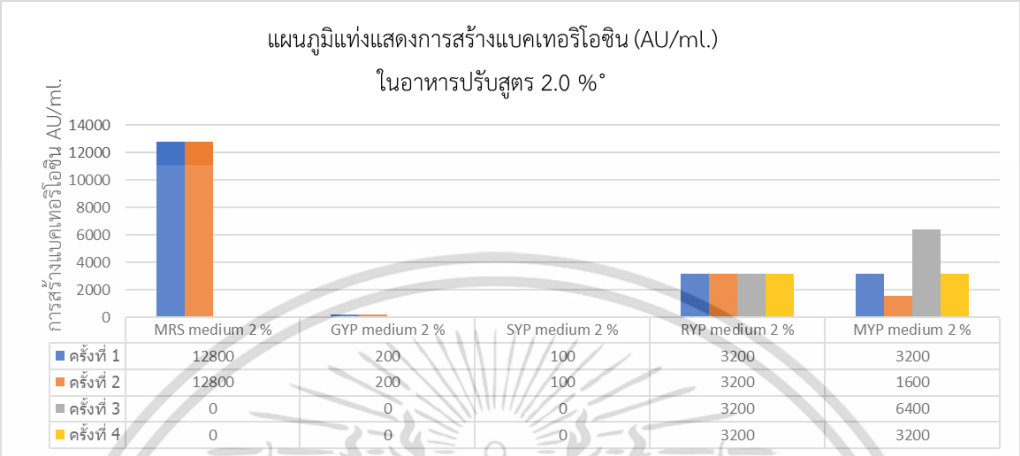
4.3.2. การศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ ทำการศึกษาตามหัวข้อ 3.5.6. ดูการเกิดโซนการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียแลกติค แผนภูมิแท่งที่ 4.3.3. การศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ เมื่อทำการทดสอบโดยใช้น้ำตาล 6 %˚Brix ของน้ำตาล



จากการศึกษาแผนภูมิแท่งรูปที่ 4.3.2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่แสดงผลการสร้างแบคเทอริโอซินได้ดีที่สุดคือ RYP medium สามารถสร้างแบคเทอริโอซินเท่ากับ 800 AU/ml. SYP medium สามารถสร้างแบคเทอริโอซินเท่ากับ 400 AU/ml. และ MYP medium สามารถสร้างแบคเทอริโอซินเท่ากับ 200 AU/ml. เมื่อปรับปริมาตรเป็น 6 % ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัย Effect of Growth Medium on Bacteriocin Production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a Strain Isolated from Boza S.D. TODOROV. (2005) ที่มีการรายงานว่า อาหาร MRS broth สามารถสร้าง bacteriocin ได้สูงสุด 12,800 AU/ml. แต่ในการใช้น้ำตาลกลูโคส (GYP broth) ในงานวิจัยนี้ มีการสร้าง bacteriocin ที่ต่ำกว่าในงานวิจัยของ S.D. TODOROV. (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

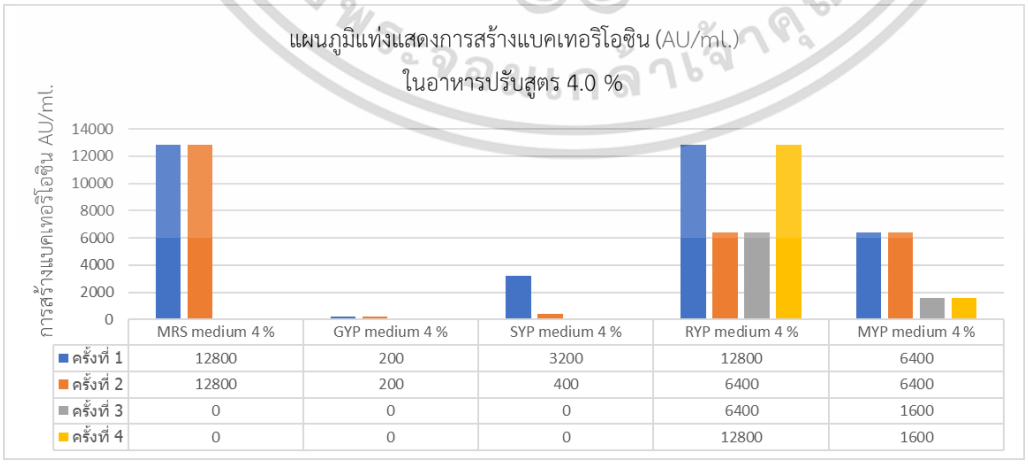
แผนภูมิแท่งที่ 4.3.4. การศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ เมื่อทำการทดสอบโดยใช้น้ำตาล 2.0 % ของอาหาร



	MRS medium 2 %	GYP medium 2 %	SYP medium 2 %	RYP medium 2 %	MYP medium 2 %
ครั้งที่ 1	12800	200	100	3200	3200
ครั้งที่ 2	12800	200	100	3200	1600
ครั้งที่ 3	0	0	0	3200	6400
ครั้งที่ 4	0	0	0	3200	3200

จากการศึกษาการปรับสูตรอาหารโดยน้ำตาลชนิดต่างๆทดแทนการใช้น้ำตาลกลูโคส พบว่าการใช้กากน้ำตาล (MYP medium) 2.0 % แทนน้ำตาลกลูโคสให้ผลการสร้างแบคเทอริโอซินได้ดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ มีค่าเท่ากกับ 6,400 AU/ml. แต่ไม่คงที่ ในอาหาร RYP medium มีการสร้างแบคเทอริโอซินเท่ากับ 3,200 AU/ml. มีการสร้างอย่างคงที่ ในของอาหาร GYP medium และ SYP medium พบการสร้างปริมาณน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานผลของ S.D. TODOROV. (2004) มีใช้น้ำตาลทรายขาวในการทดแทนน้ำตาลกลูโคสพบว่าในน้ำตาลทรายแดงมีการสร้าง bacteriocin 200 AU/ml. ในขณะที่ เมื่อใช้น้ำตาลกลูสพบการสร้าง bacteriocin ได้ถึง 3,200 AU/ml.

แผนภูมิแท่งที่ 4.3.5. การศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ เมื่อทำการทดสอบโดยใช้น้ำตาล 4.0 % ของอาหาร

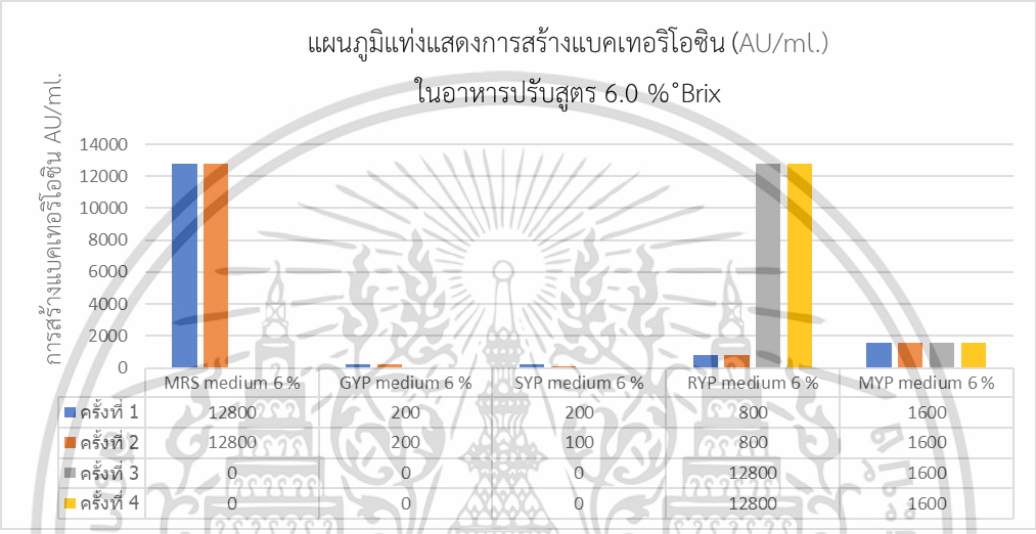


	MRS medium 4 %	GYP medium 4 %	SYP medium 4 %	RYP medium 4 %	MYP medium 4 %
ครั้งที่ 1	12800	200	3200	12800	6400
ครั้งที่ 2	12800	200	400	6400	6400
ครั้งที่ 3	0	0	0	6400	1600
ครั้งที่ 4	0	0	0	12800	1600

จากการศึกษาการปรับสูตรอาหารโดยน้ำตาลชนิดต่างๆทดแทนการใช้น้ำตาลกลูโคส พบว่าการใช้น้ำตาลทรายดิบ (RYP medium) 4.0 % แทนน้ำตาลกลูโคสให้ผลการสร้างแบคเทอริโอซินได้ดีกว่าน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดอื่นๆ เท่ากับ 12,800 AU/ml. เทียบเท่ากับอาหาร MRS medium ในอาหาร MYP medium พบการสร้างแบคเทอริโอซินสูงสุดเท่ากับ 6,400 AU/ml. ในอาหาร SYP medium สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุดเท่ากับ 3,200 AU/ml. และในอาหาร GYP medium สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้เล็น้อย แผนภูมิแท่งที่ 4.3.6. การศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ เมื่อทำการทดสอบโดยใช้น้ำตาล 6.0 % ของอาหาร



	MRS medium 6 %	GYP medium 6 %	SYP medium 6 %	RYP medium 6 %	MYP medium 6 %
ครั้งที่ 1	12800	200	200	800	1600
ครั้งที่ 2	12800	200	100	800	1600
ครั้งที่ 3	0	0	0	12800	1600
ครั้งที่ 4	0	0	0	12800	1600

จากการศึกษาการปรับสูตรอาหารโดยน้ำตาลชนิดต่างๆทดแทนการใช้น้ำตาลกลูโคส พบว่าการใช้น้ำตาลทรายดิบ (RYP medium) 6.0 % แทนน้ำตาลกลูโคสให้ผลการสร้างแบคเทอริโอซินได้ดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ เท่ากับ 12,800 AU/ml. เทียบเท่ากับการสร้างแบคเททอริโอซินของอาหาร MRS medium ในอาหาร MYP medium มีการสร้างแบคเทอริโอซินเท่ากับ 1,600 AU/ml. และสร้างอย่างคงที่ ในอาหาร GYP medium และ SYP medium พบการสร้างปริมาณน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3. การศึกษาลักษณะการเกิดบริเวณการยับยั้งของ ไนซิน ที่ผลอตจากแบคเทียเรียแลคติค

จากการศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินด้วยเชื้อ *Lactococcus lactis* P2 และมีเชื้อ Listeria innocua เป็นเชื้อ indicator โดยศึกษาการเกิดบริเวณใสของบริเวณที่ทำการสปอท์ตสารละลายที่คาดว่าเป็น ไนซิน ที่ *Lactococcus lactis* P2 สร้างขึ้นจากกระบวนการแยกเซลล์

รูปที่ 4.3.3. ผลการทดลองการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium

จากการศึกษาพบว่า เกิดบริเวณการยับยั้งที่ชัดเจน โดยสังเกตุจากการเกิดบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากรูปที่ 4.3.6. พบการสร้างแบคเทอริโอซินเท่ากับ 12,800 AU/ml.

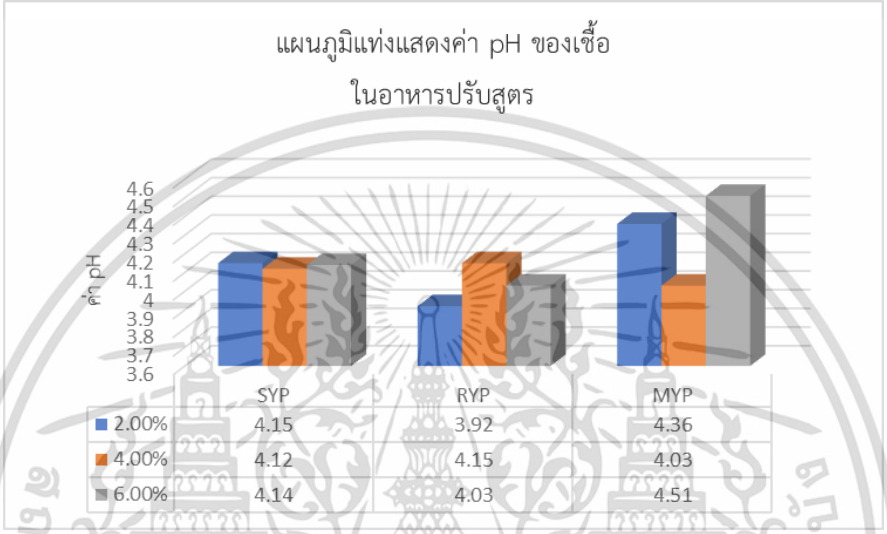
รูปที่ 4.3.4. ผลการทดลองการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RYP medium 4.0 % ของอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาพบว่า เกิดบริเวณการยับยั้งที่ชัดเจน โดยสังเกตุจากการเกิดบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากรูปที่ 4.3.7. พบการสร้างแบคเทอริโอซินเท่ากับ 12,800 AU/ml.

4.4. การศึกษาการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติก ประเมิลจากค่า pH

แผนภูมิแท่งที่ 4.4.1. การศึกษาการวัดค่า pH ในอาหารที่ปรับสูตรน้ำตาลปรับเป็น 2.0 4.0 และ 6.0 %



จากการศึกษาการปรับสูตรอาหารโดยน้ำตาลชนิดต่างๆทดแทนการใช้น้ำตาลกลูโคส พบว่าการใช้น้ำตาลทรายดิบ (RYP medium) 4.0 % แทนน้ำตาลกลูโคสให้ผลการวัดค่า pH ต่ำกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ มีค่า pH เท่ากับ 3.92, 4.15 และ 4.03 ตามลำดับ ในอาหาร SYP medium มีค่า pH เท่ากับ 4.15, 4.12 และ 4.14 ตามลำดับ และในอาหาร MYP medium มีค่า pH เท่ากับn4.36, 4.03 และ 4.51 ตามลำดับ

จากการศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินของอาหารปรับสูตรน้ำตาลข้างต้น สามารถสรุปได้ว่าควรใช้อาหารที่มีการปรับสูตรโดยใช้น้ำตาลทรายดิบ (RYP medium) 4.0 % แทนการใช้น้ำตาลกลูโคส เพื่อใช้ในการทดสอบโดยกระบวนการ ในขั้นตอนถัดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5. การศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซิน จาก ไนซิน ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก โดยใช้ XAD 16 ในการสกัด ไนซิน และทำให้เข้มข้นตามข้อ 3.5.8.

ตารางที่ 4.5.1. การศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซิน จาก ไนซิน ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก โดยใช้ XAD 16 ในการสกัด ไนซิน และทำให้เข้มข้น

ผลการทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินในขั้นตอน Ion-exchange	
ชนิดสารละลาย	AU/ml.
น้ำหมัก	12,800
น้ำล้าง Column (De-ironize water)	ไม่พบ
น้ำล้าง Column (40 % EtOH)	ไม่พบ
สารละลายSupernatant Isopropanol 70% + Isopropanol 100%	9,485,000
สารละลายหลัง Evaporation	104,857,600

จากการศึกษาพบว่า น้ำหมักมีการสร้างแบคเทอริโอซินในขั้นต้น 12,800 AU/ml. ในน้ำล้าง Column (De-ironize water) ไม่พบการสร้างแบคเทอริโอซิน ในน้ำล้าง Column (40 % EtOH) ไม่พบการสร้างแบคเทอริโอซิน ในน้ำล้าง ในสารละลายSupernatant Isopropanol 70% + Isopropanol 100% มีการสร้างแบคเทอริโอซินใน 9,485,000 AU/ml. และในสารละลายหลัง Evaporation มีการสร้างแบคเทอริโอซินใน 104,857,600 AU/ml.โดยใช้หลักการแลกเปลี่ยนไอออนของ XAD 16 (สาร Amberlite) กับสารที่สกัดได้จากน้ำหมัก เพื่อผลักไอออนของสิ่งปนเปื้อนออก ให้สารสกัดมีความบริสุทธ์ Dąbrowski, A. (2004).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1. สรุปผล

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อที่ผลิต ไนซิน โดยการปรับสูตรอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆมาใช้ทดแทนการใช้น้ำตาลกลูโคส ที่มีราคาสูง ให้มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดก่อโรค โดยทำการวัด %˚Brix ของสารละลายมาตรฐานของอาหาร De Man, Rugose and Sharpe broth (MRS broth) และ Glucose Yeast peptone (GYP broth) ได้ค่าเท่ากับ 6.0 และ 4.0 %˚Brix เพื่อใช้ในการปรับค่าน้ำตาลในอาหารปรับสูตรจนได้ปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมในอัตรา 1:1 ในการศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินในงานวิจัยเล่มนี้ใช้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตกรดแลคติก คือ (*Lactococcus lactis* P2) ร่วมกับจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวชี้วัดในการทดสอบการยับยั้ง คือ *Listeria innocua* เมื่อทำการทดลองในขั้นที่หนึ่งโดยปรับสูตรอาหาร GYP medium เป็น SYP medium (ใช้น้ำตาลทรายแทนน้ำตาลกลูโคส) RYP medium (ใช้น้ำตาลทรายดิบแทนน้ำตาลกลูโคส) และ MYP medium (ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำตาลกลูโคส) และปรับความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาล เท่ากับ 6.0 %˚Brix พบว่าการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และการสร้างแบคเทอริโอซินไม่แตกต่างกัน ในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารปรับสูตร SYP medium RYP medium และ MYP medium มีค่าเท่ากับ $2.9x10^7$ $2.7x10^8$ และ $1.6x10^8$ CFU/ml. ตามลำดับ และแสดงผลการสร้างแบคเทอริโอซิน เท่ากับ ($200^{(1)}$,$400^{(2)}$) ($200^{(1)}$,$800^{(2)}$) และ ($200^{(1)}$,$200^{(2)}$) AU/ml. ตามลำดับ จึงทำการทดลองในขั้นที่สอง คือ การปรับความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 4.0 และ 6.0 %˚Brix ของอาหารปรับสูตรน้ำตาลทั้งสามชนิด พบว่าในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารปรับสูตร SYP medium ที่ความเข้มข้น 2.0 4.0 และ 6.0 %˚Brix ของสารละลายน้ำตาล มีค่าเท่ากับ $2.0x10^9$ $2.0x10^9$ และ $2.3x10^9$ CFU/ml. ตามลำดับ แสดงผลการสร้างแบคเทอริโอซิน เท่ากับ 100 3200 และ 200 AU/ml. ตามลำดับ และมีค่า pH เท่ากับ 4.15 4.12 และ 4.14 ตามลำดับ ในอาหารปรับสูตร RYP medium ที่ความเข้มข้น 2.0 4.0 และ 6.0 %˚Brix ของสารละลายน้ำตาล มีค่าเท่ากับ $1.8x10^9$ $5.1x10^9$ และ $1.8x10^9$ CFU/ml. ตามลำดับ แสดงผลการสร้างแบคเทอริโอซิน เท่ากับ 3,200 12,800 และ 12,800 AU/ml. ตามลำดับ และมีค่า pH เท่ากับ 3.92 4.15 และ 4.03 ตามลำดับ และในอาหารปรับสูตร MYP medium ที่ความเข้มข้น 2.0 4.0 และ 6.0 %˚Brix ของสารละลายน้ำตาล มีค่าเท่ากับ $1.3x10^7$ $3.1x10^9$ และ $1.6x10^8$ CFU/ml. ตามลำดับ แสดงผลการสร้างแบคเทอริโอซิน เท่ากับ 6,400 6,400 และ 1,600 AU/ml. ตามลำดับ และมีค่า pH เท่ากับ 4.36 4.03 และ 4.51 ตามลำดับ (ทั้งนี้ในการรายงนผลแสดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าสูงสุดที่เชื้อจุลินทรีย์สร้าง) จากการทดลองในขั้นที่หนึ่งและขั้นที่สอง สามารถสรุปได้ว่าอาหารปรับสูตรที่ดีที่สุดในการทดลองนี้คือ RYP medium 4 %˚Brix ของสารละลายน้ำตาล เนื่องจากให้ค่าการเจริญสูงสุดเท่ากับ $5.1x10^9$ CFU/ml. และสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ 12,800 AU/ml. จึงเหมาะสมในการนำไปทดลองในขั้นที่สาม คือ Ion-exchange method โดยการปรับปริมาตรเป็น ขนาด 1 ลิตร แสดงผลการเจริญของเชื้อเท่ากับ $1.5x10^9$ CFU/ml. และสร้างแบคเทอริโอซินก่อนการทำให้เข้มข้นเท่ากับ 12,800 AU/ml. และหลังจากทำให้เข้มข้น(Evaporation) เท่ากับ 104,857,600 AU/ml.

5.2. ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการทำซ้ำในหัวข้อ Ion-exchange method มากกว่าสองครั้งเพื่อความน่าเชื่อถือของผลงาน

5.2.2 ควรเพิ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวชี้วัดการสร้างแบคเทอริโอซิน เพื่อความหลากหลายของ ไนซิน ที่เชื้อกลุ่มแลคติกสามารถผลิตขึ้นได้

5.2.3 ควรเพิ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบการสร้าง ไนซิน เพื่อความหลากหลายของกลุ่มจุลินทรีย์แลคติก และการนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กิตติคุณ ซื่อวิริยพันธุ์ และคณะ.(2552).การผลิตแบคทีเรียแลคติกสำหรับเนื้อหมักพื้นบ้านของไทย (แหนม) อุตสาหกรรมเกษตร.สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชฎาพร ชูยส และคณะ.(2552).การลดลงของ *Salmonella Anatum* และ *Salmonella Ratchaburi* ในรูปแบบแหนมจำลองจากการใช้ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่ผลิต Pediocin PA-1.อุตสาหกรรมเกษตร.สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชญานาถ และ ศิรินุช.(2559).ผลของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคทันตกรรม.อุตสาหกรรมเกษตร.สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ณัฐฐิณี จรกา.(2560).ประสิทธิผลของกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR536 ต่อการผลิตแหนมปลอดภัย.อุตสาหกรรมเกษตร.สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธัญลักษณ์ ชัยตระกูลเสรี และคณะ.(2558).ผลของการเติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและปริมาตรแบคทีเรียแลคติกในแหนม.อุตสาหกรรมเกษตร.สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ประภัสสร บุญสร้อย และคณะ.(2552).การเจริญของ *Leifsonia spp.* และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในอาหาร GYP อุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พิพัฒน์ พิเชษฐพงษ์ และ อุทัยวรรณ อินทร์เจริญ. 2553.การแยกสารโดยใช้เรซินที่เอิบชุ่มด้วยตัวสกัด (Extraction by solvent impregnated resin) [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อ 12 มิถุนายน,2563, จากเว็บไซต์ http://www0.tint.or.th/

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ค่าทางน้ำตาลและสารอนุพันธ์. (2019). ชนิดของน้ำตาล. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อ Apr 27, 2020, จากเว็บไซต์ https://www.csdlabservices.com

ศตพร กันแก้ว. (2549). ความเป็นไปได้ในการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่เหลือจากอุตสาหกรรมอาหารเพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ ในการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อ 3 ธันวาคม, 2563, จากเว็บไซต์http://med.swu.ac.th/microbiology/index.php/component/k2/item/31

สุนทรีพร จันทร์แสนตอ. 2538. การใช้ยูเรีย-กากน้ำตาล-แร่ธาตุชนิดก้อนเป็นอาหารเสริมของโค. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม (ต่อ)

Barefoot, S. F., & Klaenhammer, T. R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus. *Appl. Environ. Microbiol.*, *45*(6), 1808-1815.

BHARTI, V., MEHTA, A., SINGH, S., JAIN, N., AHIRWAL, L., and MEHTA, S. (2015). BACTERIOCIN: A NOVEL APPROACH FOR PRESERVATION OF FOOD.

Innovative Food Processing Technologies. (2016). Molasses. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อ Apr 27, 2020, จากเว็บไซต์ https://www.sciencedirect.com/topics/food-science/molasses

Dąbrowski, A., Hubicki, Z., Podkościelny, P., & Robens, E. (2004). Selective removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method. *Chemosphere*, *56*(2), 91-106.

Guyonnet, D., Fremaux, C., Cenatiempo, Y., & Berjeaud, J. M. (2000). Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Appl. Environ. Microbiol.*, *66*(4), 1744-1748.

Kenneth, T. (2010). Lactococcus lactis Wisconsin's State Microbe. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อ Apr 27, 2020, จากเว็บไซต์ https:// textbookofbacteriology.net

Kenneth, T. (2010). Lactococcus lactis Wisconsin's State Microbe, Nisin. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อ Apr 27, 2020, จากเว็บไซต์ https:// textbookofbacteriology.net

Preecha Poompuenpon, Pongtep Wilaipun, Nongnuch Raksakulthai and Sunee Nitisinprasert. (2010). Isolation of Antimicrobial-Producing Lactic Acid Bacteria from Gastrointestinal Tract of Ornamental Fish. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อ Apr 28, 2020, จากเว็บไซต์ http://www.lib.ku.ac.th/kuconf/KC4504073.pdf

Feiner, G. (2016). Sucrose (saccharose) is a nonreducing sugar and is made of one unit of d-glucose and one unit of d-fructose. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อ Apr 27, 2020, จากเว็บไซต์ https:// https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/sucrose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม (ต่อ)

Loughnane. S. (2006). Ion-exchange chromatography. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อ Apr 28, 2020, จากเว็บไซต์ https://www.sciencelearn.org.nz/resources/2046-ion-exchange-chromatography

Schillinger, U., Geisen, R., & Holzapfel, W. H. (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science & Technology*, *7*(5), 158-164.

Todorov, S. D., van Reenen, C. A., & Dicks, L. M. T. (2004). Optimization of bacteriocin production by Lactobacillus plantarum ST13BR, a strain isolated from barley beer. *The Journal of general and applied microbiology*, *50*(3), 149-157.

Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2005). Lactobacillus plantarum isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, *36*(2-3), 318-326.

Toxicological Survey of African Medicinal Plants. (2014). Glucose. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อ Apr 27, 2020, จากเว็บไซต์ https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/glucose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

การสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลคติก Lactococcus lactis (P2)

รูปที่ ก.1. ภาพการทดสอบเพื่อคัดเลือกสายพันธ์แบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติก เพื่อใช้ในการศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินโดยใช้ Listeria innocua เป็นจุลินทรีย์ Indicator

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบคือ

SKI2 = *Lactobacillus plantarum* SKI2

SB2 = *Lactococcus lactis* (SB2)

P2 = *Lactococcus lactis* (P2)

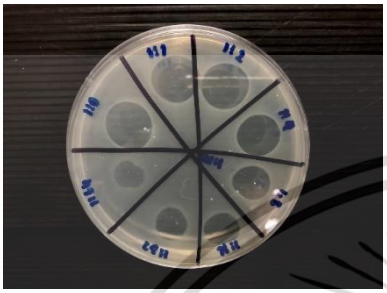
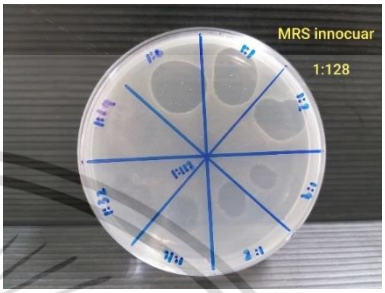
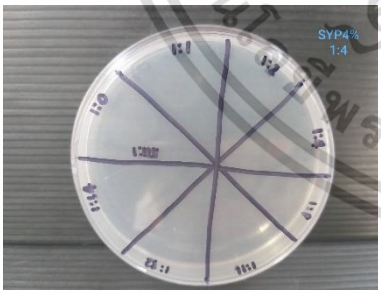
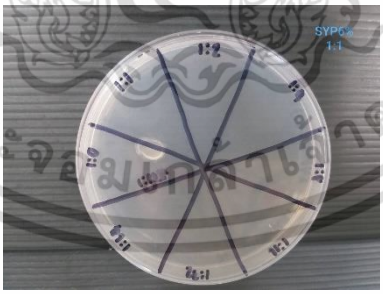
NCDO = *Lactococcus lactis* NCDO

536 = *Pediococcus pentosaceus* 536

รูปที่ ก.2. ภาพการเจริญของแบคทีเรียแลคติก Lactococcus lactis (P2) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบปรับสูตรน้ำตาล RYP medium 4 % น้ำตาลทรายดิบ

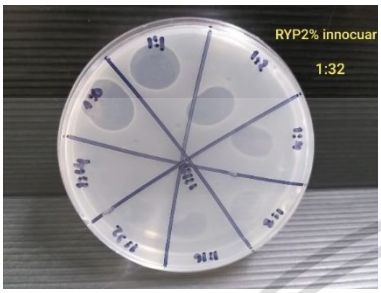
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.3. ตารางแสดงภาพการทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินโดยใช้ Listeria innocua เป็นจุลินทรีย์ Indicator

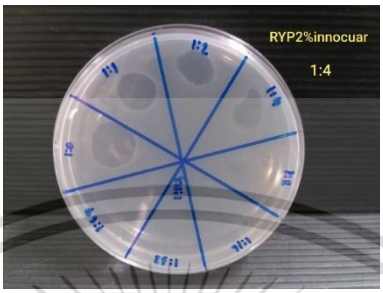
อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกสูตรมาตรฐาน MRS (Oxoid,UK)	
	
Medium MRS	Medium MRS
อาหารเลี้ยงเชื้อปรับสูตรน้ำตาล SYP medium	
Medium SYP 2 %	Medium SYP 2 %
Medium SYP 4 %	
	
Medium SYP 4 %	Medium SYP 6 %
Medium SYP 6 %	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

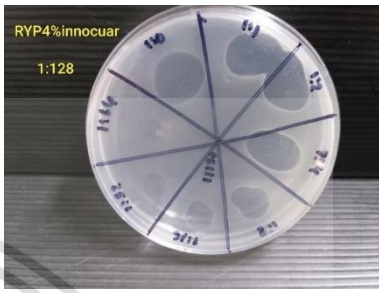
อาหารเลี้ยงเชื้อปรับสูตรน้ำตาล RYP medium



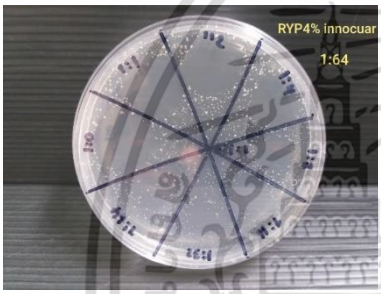
Medium RYP 2 %



Medium RYP 2 %

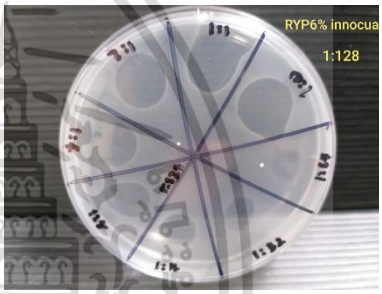


Medium RYP 4 %



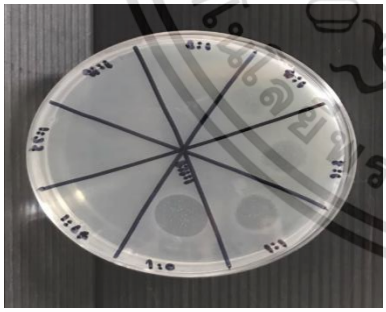
Medium RYP 4 %

Medium RYP 6 %



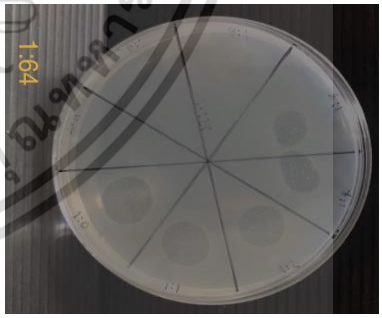
Medium RYP 6 %

อาหารเลี้ยงเชื้อปรับสูตรน้ำตาล MYP medium



Medium MYP 2 %

Medium MYP 2 %



Medium MYP 4 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Medium MYP 4 %

Medium MYP 6 %

Medium MYP 6 %

ตารางที่ ก.4. ตารางแสดงภาพการทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินโดยใช้ Listeria innocua เป็นจุลินทรีย์ Indicator โดยใช้การสกัดด้วย XAD 16 ในอาหารปรับสูตร RYP medium 1 L.

6400 AU/ml.

1,638,400 AU/ml.

104,857,500 AU/ml.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ตารางที่ ข.1. ตารางสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacteria Screening Medium (BSM broth) ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ชนิดสารเคมี	ปริมาตร	หน่วย
Glucose	2.0	g.
Beef extract	2.0	g.
Tryptone	10.0	g.
K_2HPO_4	8.7	g.
KH_2PO_4	8.0	g.
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	g.
$MnSO_4.4H_2O$	0.05	g.
Tween 80	1	ml.
Citric acid diammonium salt	2.0	g.
Agar	15.0	g.
ปรับ pH 6.8-7.0		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ ข.2. ตารางสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ DE Man, Rogosa and Sharpe (MRS broth) (Oxoid, UK) ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ชนิดสารเคมี	ปริมาตร	หน่วย
Peptone	10.0	g.
'Lab-lemco 'powder	8.0	g.
Yeast extract	4.0	g.
Glucose	20.0	g.
Sorbitan mono-oleate	1.0	ml.
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0	g.
Sodium citrate $3H_2O$	5.0	g.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Triammonium citrate	**2.0**	**g.**
Magnesium sulphate $7H_2O$	**0.2**	**g.**
Manganese sulphate $4H_2O$	**0.05**	**g.**
Agar	**10.0**	**g.**
pH 6.2 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส		

(ถ้าต้องการให้อาหารแข็งให้เติมAgar 15 g.ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 Liter)

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ ข.3. ตารางสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose Yeast peptone (GYP broth) ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ชนิดสารเคมี	ปริมาตร	หน่วย
Glucose	10.0	g.
Sodium citrate Anhydrous	10.0	g.
Yeast extract	10.0	g.
Peptone	10.0	g.
Stock solution (Nacl, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$)	10.0	ml.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ ข.4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA broth) (Difco, BBL/USA)ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ชนิดสารเคมี	ปริมาตร	หน่วย
Pancreatic Digest of Casein	17.0	g.
Papaic Digest of Soybean	3.0	g.
Dextrose	2.5	g.
Sodium Chloride	5.0	g.
Dipotassium Phosphate	2.5	g.
pH 6.2 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส		

(ถ้าต้องการให้อาหารแข็งให้เติมAgar 15 g.ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 Liter)

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.5. ตารางสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Sucrose Yeast peptone (SYP broth) ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ชนิดสารเคมี	ปริมาตร	หน่วย
Sucrose	6.0	g.
Sodium citrate Anhydrous	1.0	g.
Yeast extract	1.0	g.
Peptone	1.0	g.
Stock solution (Nacl, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$)	1.0	ml.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ ข.6. ตารางสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Raw sugar Yeast peptone (RYP broth) ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ชนิดสารเคมี	ปริมาตร	หน่วย
Row sugar	6.0	g.
Sodium citrate Anhydrous	10.0	g.
Yeast extract	10.0	g.
Peptone	10.0	g.
Stock solution (Nacl, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$)	10.0	ml.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.7. ตารางสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Molasses Yeast peptone (MYP broth) ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ชนิดสารเคมี	ปริมาตร	หน่วย
Molasses	7.0	g.
Sodium citrate Anhydrous	10.0	g.
Yeast extract	10.0	g.
Peptone	10.0	g.
Stock solution (Nacl, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$)	10.0	ml.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาววริศรา จุติมูสิก
วัน เดือน ปี เกิด	18 ธันวาคม 2540
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลาย ที่โรงเรียนโยธินบูรณะ จ. กรุงเทพมหานคร ปัจจุบันศึกษาอยู่ที่คณะอุตสาหกรรมเกษตรหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์ทำงาน	บริษัท ไทย สพิริท อินดัสทรี จ.ฉะเชิงเทรา
ผลงานทางวิชาการ	1. การเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อที่ผลิต ไนซิน (*Lactococcus lactis* P2) จากอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ.(2562)

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวศรัญญา จันสมุทร
วัน เดือน ปี เกิด	4 เมษายน 2540
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลาย ที่โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ เตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ จ.สมุทรปราการ ปัจจุบันศึกษาอยู่ที่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์ทำงาน	บริษัท ไทย สพิริท อินดัสทรี จ.ฉะเชิงเทรา
ผลงานทางวิชาการ	1. การศึกษาสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรและพลูคาวต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์.(2558) 2. การเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อที่ผลิต ไนซิน (*Lactococcus lactis* P2) จากอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ.(2562)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวศรัญญา ตงประเสริฐ
วัน เดือน ปี เกิด	9 เมษายน 2541
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลาย ที่โรงเรียนสิริรัตนาธร จ.กรุงเทพมหานคร
	ปัจจุบันศึกษาอยู่ที่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
	หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์ทำงาน	บริษัท อินเตอร์เทค เทสติ้ง เซอร์วิสเซส (ประเทศไทย) จำกัด
	จ.กรุงเทพมหานคร
ผลงานทางวิชาการ	1. การเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อที่ผลิต ไนซิน
	(*Lactococcus lactis* P2) จากอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ.(2562)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้